



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Programa Doctorado Biociencias Moleculares

Papel de la interacción de IGF-I y estradiol en las diferencias sexuales en regulación del estado de ánimo mediante ejercicio físico.

Tesis Doctoral

VICTOR ANUART MUNIVE HERRERA

Madrid, 2017



Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Papel de la interacción de IGF-I y estradiol en las
diferencias sexuales en regulación del estado de ánimo
mediante ejercicio físico.**

Memoria Presentada por

Víctor Anuart Munive Herrera

Licenciado en Biomedicina para optar al título de Doctor

Bajo la dirección del Profesor Ignacio Torres Aleman

Realizada en el Instituto Cajal, CSIC



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Don Ignacio Torres Aleman, Profesor de Investigación del Instituto Cajal perteneciente al CSIC.

CERTIFICA:

Que Don Víctor Anuart Munive Herrera, siendo Licenciado en Biomedicina y Máster en Biología Celular y Molecular, ha realizado el presente trabajo de investigación bajo mi dirección y que este corresponde a su Tesis Doctoral titulada: **“Papel de la interacción de IGF-I y estradiol en las diferencias sexuales en regulación del estado de ánimo mediante ejercicio físico”**

Una vez revisada, considero que dicha memoria reúne todos los requisitos necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente, por lo que AUTORIZO su presentación.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo este documento en Madrid a 7 de Febrero de 2017.

Director de Tesis

Tutor

Fdo. Ignacio Torres Aleman

Fdo. María Isabel Sánchez Pérez

A mis Padres

Agradecimientos

Gracias al Prof. Ignacio Torres Alemán por darme la oportunidad de empezar a hacer ciencia y poder realizar la presente tesis doctoral en su laboratorio, por su comprensión, confianza y guía para hacer que todo encaje gracias.

Gracias a Lola por sus consejos, su inestimable ayuda durante toda la tesis, su sonrisa diaria y gran calidad humana, gracias por las comidas de los lunes, la mejor comida de España.

Gracias a todas las personas del Instituto Cajal, empezando por el laboratorio:

Gracias Edwin, Andrea, Angel, por todas las tardes que pasamos en el laboratorio incluidas las comidas y viajes.

Laura, Carolina, Miguel y Ana por ser un excepcional equipo.

Gracias a las grandes personas que forman parte del Cajal que me han ayudado y enseñado tanto Irene, Patri, Eva, Andrea Chal, Simona.

Gracias a la gente de servicios por ayudarme con los experimentos, Carmen y Belen por la adquisición de imágenes, Ainoha por realizar conducta en tiempos difíciles, especialmente a Silvia por su asesoría en biología molecular, Gracias M^a Ángeles de la biblioteca por su rápida respuesta para adquirir artículos.

Gracias a Angelica, Luzma, Ana, Ivan, Gema, Alberto, Veronica, Lorena, por su amistad durante todo este tiempo

Gracias a todos los que he conocido y que me ayudaron totalmente, me quedo con lo mejor de cada uno.

Quiero agradecer a mis padres por el apoyo que siempre me han dado, tanto en lo personal como en lo académico. Que cada vez que vuelvo a casa me reciben con mismo amor que cuando era un niño, sin importar el tiempo que pase.

Gracias a mi hermano por ayudarme y animarme durante toda mi estancia en España haciendo que sea más fácil. Gracias a mi hermana por sus locuras y escucharme.

También al resto de mi familia, pero sobre todo a mis tíos Lucy y Rafael por apostar por mí y así poder empezar esta gran experiencia que ha sido la Tesis.

Gracias muy especiales a Eva, que llegó justo a tiempo para soportar la escritura de la Tesis. Gracias por ser y estar conmigo.

Resumen

Uno de los grandes problemas de la investigación biomédica es no tener en cuenta las diferencias sexuales en la mayoría de los ensayos de experimentación básica y

preclínicos; lo que conlleva a efectos secundarios indeseados en la población excluida. Este inconveniente en el diseño experimental se considera un problema de salud pública a tal grado que los institutos de Salud norteamericanos (NIH) propusieron en 2014 varios objetivos con la finalidad de reducir y evitar este sesgo en la investigación. Con estas pautas, y la creciente evidencia de diferencias sexuales en la mayoría de los órganos y sistemas en mamíferos, este tema ha ganado relevancia en los últimos años. Incluir las diferencias sexuales en el diseño experimental aporta información importante para la comprensión de la etiología de enfermedades con mayor prevalencia en un género determinado, como los trastornos del estado del ánimo y la enfermedad de Alzheimer, que hasta la fecha sigue sin vislumbrarse.

Se ha demostrado que los niveles de IGF-I son sexualmente dimórficos en mamíferos incluido el ser humano. Pero, aun no se ha reportado el significado funcional del dimorfismo sexual de IGF-I y su posible implicación en los trastornos del estado del ánimo y en la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, esta Tesis doctoral tiene como objetivo analizar las diferencias de género usando el ejercicio físico como modulador de IGF-I y del estado de ánimo, ya que previamente se ha demostrado que realizar actividades físicas induce el paso de IGF-I desde la sangre hacia el cerebro con efectos beneficiosos en la salud.

Observamos que hay dimorfismo sexual en los niveles de ansiedad, resistencia al estrés, estado de alerta y de IGF-I en respuesta a ejercicio físico, y que en hembras depende de las hormonas ováricas para realizar su efecto, específicamente a través del receptor alfa de estrógenos a nivel de la barrera hematoencefálica. De hecho tanto IGF-I como estradiol son importantes para ejercer los efectos beneficiosos del ejercicio en el estado de ánimo. Además aportamos evidencia de la posible desregulación del eje de IGF-I en ratones hembra de mediana edad, normales y APP/PS1 como modelo de la enfermedad de Alzheimer.

De este modo consideramos que el ejercicio físico, además de ser terapéutico, puede emplearse como un estímulo fisiológico para facilitar el estudio de la fisiopatología de estas y otras enfermedades.

Summary

One of the biggest problems in biomedical research is to not consider sexual differences in the most assays of basic and preclinical experimentation, which leads to undesired side effects in the excluded population. This inconvenience in the experimental design is considered such a public health problem that the North American Institutes of Health (NIH) proposed in 2014 several objectives in order to reduce and avoid this bias in research. Following these guidelines, and due to the growing evidence of sexual dimorphism in most organs and systems of mammals, this issue has gained relevance in recent years.

Including sexual differences in the experimental design enables to obtain valuable information for understanding the etiology of diseases that have a higher prevalence in a specific gender, such as mood disorders and Alzheimer's disease, and up to date is still unknown.

It has been reported that IGF-I shows sexual dimorphism regarding its levels in male and female mammals, including humans. However, the functional significance of the sexual dimorphism of IGF-I and its possible implication in mood disorders and Alzheimer's disease has not yet been published. Thus, the aim of this PhD Thesis is to analyze the gender differences by physical exercise as a modulator of IGF-I and mood.

To achieve the objective of this work, we used physical exercise, since it has previously been demonstrated that physical activities induce the passage of IGF-I from the blood to the brain with beneficial effects on health. Thus, we observed that there is sexual dimorphism in anxiety, stress resilience, arousal and IGF-I levels in response to physical exercise. Furthermore we demonstrated that, in the case of females, the response to physical exercise depends on the ovarian hormones, specifically through the estrogen receptor α in the blood-brain barrier. Indeed both IGF-I and estradiol are important to exert the beneficial effects of the physical exercise in mood. Finally, we also provide evidence of the possible deregulation of the IGF-I axis in middle aged female wild type and middle aged female APP / PS1 mice as a model of Alzheimer's disease.

In this way, we consider that the physical exercise, besides being therapeutic, can be used as a physiological stimulus to facilitate the study of the pathophysiology of these and other diseases.

Índice

<i>Resumen</i>	<i>7</i>
----------------------	----------

Summary.....	9
Índice	11
Clave de abreviaturas.....	15
Introducción	16
Dimorfismo sexual a nivel central.....	17
El factor de crecimiento parecido a insulina tipo i (IGF-I).....	18
IGF-I periférico.....	19
Células endoteliales e IGF-I	22
El receptor de IGF-I (IGF-IR)	23
Señalización de IGF-I mediada por su receptor.....	23
Estradiol e IGF-I	24
Ejercicio Físico e IGF-I	25
El IGF-I en la mediana edad	26
Enfermedad de Alzheimer e IGF-I	27
Objetivos.....	29
Materiales y Métodos.....	31
Animales de experimentación	32
Ratones LID	32
Ratones APP/PS1	32
Ovariectomía	33
Infección in vivo de endotelio cerebral de ratón con partículas lentivirales vía carótida ...	33
Tratamiento con MPP, antagonista específico del Receptor de Estrógeno α	34
Tratamiento con PPT, agonista específico del Receptor de Estrógeno α	34
Entrenamiento en cinta de correr	35
Análisis del comportamiento.....	35
Laberinto en cruz elevado (EPM)	36
Resistencia a estrés.....	36
Prueba de Nado Forzado (FST).....	36
Prueba de Suspensión por la cola (TST)	37
Evaluación de la actividad	37
Prueba del estado de Alerta	37
Recolección de muestras.....	38
Cultivo primario de endotelio cerebral de rata y ratón (RBEC y MBEC).....	39
Cultivo primario de plexo coroideo de rata	40

Ensayo de internalización de IGF-I biotinilado (bIGF-I).....	40
Transfecciones.....	41
Producción de partículas lentivirales	42
Plásmido ERE-GFP.....	42
Partículas lentivirales	42
Titulación de partículas virales	43
ELISA de IGF-I murino y estradiol	44
Inmunocitoquímica	44
Histología	45
Extracción de proteína y preparación de lisados	45
Western Blot	45
Extracción de ARN.....	48
Retrotranscripción por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR)	48
Análisis estadístico.....	49
Resultados	50
Dimorfismo sexual en la modulación del estado de ánimo por el ejercicio físico	51
Dimorfismo Sexual en los niveles de ansiedad pre y post ejercicio.	51
Dimorfismo Sexual de la resistencia al estrés proporcionada por el ejercicio físico	52
Micro ARN 375 como indicador de resiliencia	52
Resistencia al estrés mediada por ejercicio físico.....	52
Estado de atención esta incrementado en hembras por el ejercicio físico.	53
Diferencias sexuales en los niveles de IGF-I en respuesta al ejercicio físico.....	55
Niveles de Receptor de IGF-I en hipocampo.	56
Ejercicio Agudo	57
Las hormonas ováricas modulan los niveles de IGF-I	58
Niveles de IGF-I en suero y ARNm de IGF-I en hígado	60
Interacción de IGF-I y estradiol	61
El ejercicio físico incrementa la actividad de los receptores de estrógenos en el cerebro	63
El receptor alfa no modifica los niveles de ansiedad en hembras jóvenes	64
El ejercicio modula el estado de ánimo en parte a través del IGF-I circulante	65
Interacción entre IGF-I circulante y estradiol en la modulación del estado de ánimo a través del ejercicio físico	66
La presencia de IGF-I circulante y hormonas ováricas es necesaria para que el ejercicio regule el estado del ánimo	66
El IGF-I circulante y las hormonas ováricas son imprescindibles para que el ejercicio regule el estado de alerta.	67

Regulación del estado del ánimo a lo largo del tiempo: hembras control y APP/PS1 de mediana edad.....	68
Hembras APP/PS1 de mediana Edad.....	72
Discusión.....	75
DIMORFISMO SEXUAL EN LA MODULACIÓN DEL ESTADO DE ÁNIMO POR EL EJERCICIO FÍSICO.....	
La atención o estado de alerta	¡Error! Marcador no definido.
Resistencia al estrés.....	¡Error! Marcador no definido.
DIMORFISMO SEXUAL EN LA MODULACIÓN DE IGF-I HIPOCAMPAL POR EL EJERCICIO FÍSICO.....	
El estradiol regula la captura de IGF-I en células endoteliales del cerebro	¡Error! Marcador no definido.
Incremento de la actividad de los receptores de estrógenos en el cerebro por el ejercicio físico.....	¡Error! Marcador no definido.
Ciclo estral e IGF-I	¡Error! Marcador no definido.
EL FACTOR EDAD Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	¡Error! Marcador no definido.
Alteración del estado del ánimo en ratones APP/PSI (modelo de la enfermedad de Alzheimer)	¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones	92
Bibliografía	94
Anexos	116

Clave de abreviaturas

- ADN: Acido desoxirribonucleico
- AKT : Proteína Quinasa B
- ARNm: Acido ribonucleico mensajero
- BBB: Blood brain barrier, Barrera hemato-encefalica
- BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor Factor Neurotrofico Derivado del Cerebro
- BEC : Brain Endothelial Cells Celulas endoteliales del cerebro
- bIGF-I: Biotinylated IGF-I IGF-I Biotinilado
- BSA: Bocine Serum Albumin Albumina de Suero Bovino
- cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid Acido desoxirribonucleico complementario
- DPN: Diarylpropionitrile Diarilpropionitrilo
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- E2: Estradiol
- EBSS: Equilibrated balance salt solution
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- GH: Growth Hormone Hormona del Crecimiento
- GFP: Green Fluorescence Protein, Proteína Verde Fluorescente
- HPA: Hipotalamico-Pituitario-Adrenal
- IGF-I: Insulin like growth factor I Factor de crecimiento parecido a insulina tipo I
- IGF-IR: Insulin like growth factor I Receptor del factor parecido a la insulina tipo I
- IRSI: Insulin receptor substrate 1
- JB1: Peptido análogo de IGF-I
- LCR: Liquido Cefaloraquideo
- MPP: Metil Piperidino-Pirazol
- PBS: Phosphate buffer saline Tampón Fosfato salino
- PHTPP: Fenyl hidroxifenil Trifluorometil Pirazol Pirimidina,
- PI3K. Fosfoinositol 3-Quinasa
- PPT: Propil pirazol triol
- TBS: Tampón Tris Salino
- TTBS: Tampón Tween-Tris salino.
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor Factor de Crecimineto Endothelial Vascular
- WB: Western Blot

Introducción

Dimorfismo sexual a nivel central

Frecuentemente en la investigación biomédica se utilizan machos en la investigación básica y en los ensayos preclínicos: Este sesgo ha conllevado a desarrollar terapias o fármacos que tienen efectos secundarios en las mujeres. Actualmente no se puede obviar la creciente evidencia de las diferencias de género (de Vries y Forger 2015) y la importancia de incluir y explorar con más detalle la variable del género en la investigación biomédica para comprender mejor la fisiología y las enfermedades como los trastornos del estado del ánimo que la mayoría de la población padece. La existencia de un dimorfismo sexual a nivel central es un hecho bien conocido pero todavía mal caracterizado. Por lo cual en 2014 el NIH propuso medidas para solventar esta situación. Con estas razones este trabajo está enfocado en las diferencias sexuales del efecto del ejercicio físico sobre el IGF-I y su implicación en el estado del ánimo.

En 1849 AA Berthold, fue el primero en demostrar que el sistema nervioso central es una diana para las hormonas sexuales (Soma K-K 2006), lo cual abrió el camino para el estudio de las diferencias sexuales en este órgano. En la década de los años 40, Jost propuso el dogma central de la diferenciación sexual, que dice lo siguiente: *“La exposición a diferentes estímulos endocrinos durante la vida perinatal modifica de forma irreversible la respuesta a hormonas esteroidales en la etapa adulta”* (Jost 1947). Aunque fueron Phoenix & col. en 1959 los primeros en describir el efecto directo de las hormonas gonadales en la diferenciación sexual del cerebro. Actualmente diversos modelos preclínicos han confirmado las diferencias sexuales y la importancia de las hormonas gonadales femeninas en la emoción y cognición (ter Horst et. al. 2012).

En este sentido, el estudio de la etiología de los trastornos del estado de ánimo abordado desde la neuroendocrinología ha sido el centro de investigación durante muchas décadas. De los ejes más estudiados se encuentra el eje hipotálamo pituitaria adrenal (HPA). Este sistema endocrino se encuentra desregulado en pacientes depresivos; y lo que es más relevante, su actividad y reactividad presentan dimorfismo sexual. (Goel et. al. 2014). A su vez, el eje HPA está modulado por el hipocampo; (McEwen et. al. 1986; Jacobson & Sapolsky, 1991). Las diferencias sexuales en la regulación de este eje están bien documentadas en animales (Handa et. al. 1994; Rhodes y Rubin, 1999) y humanos (Kajantie y Philips 2006; Kudielka y Kirschbaum 2005). Por ejemplo, tanto la actividad basal como la respuesta del eje HPA generalmente están incrementadas en roedores

hembras en comparación con machos, y durante el envejecimiento se mantienen las diferencias en este eje (Rhodes y Rubin 1999). Otro eje aparte del eje HPA donde se han reportado diferencias sexuales es el eje de la hormona del crecimiento GH (del inglés, *Growth-hormone*) que presenta dimorfismo sexual modulado por hormonas gonadales (Jansson et. al. 1985; Chowen et. al. 1996), y lo que resulta especialmente importante, se ha reportado que IGF-I presenta dimorfismo sexual en humanos (Geary et. al. 2003; Baker et. al. 2010) y en roedores (Cordoba-Chacón et. al. 2016). Estas evidencias indican que las hormonas sexuales juegan un papel importante en las diferencias observadas en el comportamiento de estos ejes neuroendocrinos entre machos y hembras. Si trasladamos estas observaciones a humanos, en la literatura abundan evidencias de que las mujeres son más susceptibles a experiencias estresantes que los hombres (Nolen-Hoeksema 2012). Por lo tanto, una comprensión mayor de las diferencias de género en la regulación de las emociones puede contribuir a desentrañar las conocidas diferencias sexuales en algunos tipos de psicopatologías (Nolen-Hoeksema 1991; Hyde et. al. 2008; Zahn-Waxler et. al. 2008). En este sentido, el factor trófico IGF-I parece tener un papel en la mayoría de los desordenes del estado del ánimo mencionados (revisado por Auer et. al. 2012) porque se ha reportado que alteraciones de la función del cerebro como los desordenes afectivos pueden conllevar cambios en la secreción de IGF-I (Rusch et. al. 2015).

El factor de crecimiento parecido a insulina tipo i (IGF-I)

El factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I) es un péptido de 70 aminoácidos, descubierto en la década de los 50 por Salmon y Daughaday al demostrar que la administración *in vivo* de la hormona de crecimiento (GH) estimula la secreción de una molécula capaz de estimular la captación de sulfato en el cartílago de ratas hipofisectomizadas. A esta molécula se le denominó factor de crecimiento parecido a insulina porque tiene 48% de homología estructural con esta hormona (Rinderknecht y Humbel, 1978). Por lo tanto, pertenece a la familia de péptidos insulínicos, que está comprendida principalmente por dos grupos: “péptidos parecidos a insulina” (IGF-I, IGF-2 y la propia insulina) y otro grupo que incluye las relaxinas y otras “hormonas parecidas a insulina” (revisado por Fernández y Torres-Alemán, 2012). Su forma madura, tiene un peso de 7.649 kDa, y aunque es la principal variante se han reportado otras variantes como el IGF-I truncado o des(1-3) específica del cerebro (Giacobini et.

al. 1990) y el péptido E que se sintetiza principalmente en el musculo esquelético (Brisson y Barton, 2013; Hede et. al. 2012).

El IGF-I forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-hígado y está encargado, como función mejor establecida, de regular el crecimiento corporal. El eje neuroendocrino regulatorio incluye al hipotálamo donde se sintetiza la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH del inglés, *Growth-hormone-releasing hormone*) así como la somatostatina. Por un lado, la GHRH estimula la producción y liberación de GH en sangre actuando a nivel de Adenohipófisis. Por otro lado, la somatostatina se encarga de inhibir la síntesis y/o secreción de la GH. A su vez, la GH es captada por el hígado y promueve la síntesis y secreción de IGF-I al torrente sanguíneo para ser transportado hasta los distintos órganos diana. Al mismo tiempo el IGF-I tiene un papel importante en la regulación negativa de la secreción de GH (revisado por Frystyk J 2004). Aunque la principal síntesis y liberación de IGF-I ocurre en el hígado, y está influenciada principalmente por GH (Schwander et. al. 1983), este péptido también se sintetiza localmente en prácticamente todos los tejidos; incluso hay tejidos que pueden sintetizar IGF-I independientemente de GH en respuesta a diversos estímulos nocivos o fisiológicos (D'Ercole et. al. 1980; Isaksson et. al. 1987; Schlechter et. al. 1986).

IGF-I tiene acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas; estas acciones están reguladas por los receptores IGF-IR, IGF-2R e IR y también son reguladas (inhibidas o potenciadas) por una familia de seis proteínas de unión a IGF-I (IGFBP1- 6). Estas proteínas difieren en el dominio de unión, que posee sitios para proteólisis por proteasas específicas, incluidas metaloproteasas de matriz, lo que les confiere acciones específicas a cada una de las proteínas de unión. Las IGFBPs, además de tener acciones independientes de los IGF, se expresan en la mayoría de los tejidos (Bach L. 2015). La IGFBP3 es la principal proteína de unión a IGF-I circulante mientras que en el sistema nervioso adulto la más abundante parece ser la IGFBP2 (Ocrant et al, 1990).

IGF-I periférico

El IGF-I periférico es producido mayoritariamente por el hígado (Yakar et. al.. 1999), formando en sangre un complejo ternario (no bioactivo) con las IGFBPs (3 o 5) y una subunidad ácido lábil (ALS), para ser transportado a todos los órganos, incluido el cerebro. Aproximadamente el 80% del IGF-I circulante se encuentra unido a IGFBPs

(revisado por Bach 2015). Esta unión puede ser regulada negativamente por humanina gracias a su gran afinidad por IGFBP-3 (Chin et. al. 2013), y por otros muchos factores (Ver tabla 1) La gran cantidad de receptor de IGF-I en el cerebro con respecto a la producción endógena de su ligando, junto con el hecho de encontrar cantidades relativamente elevadas de este péptido a nivel cerebral, sugiere que el IGF-I circulante ejerce un efecto importante en el sistema nervioso central (Bach et. al. 1991; Sonntag et. al. 1999). En este sentido, ya se ha comprobado que el IGF- I sérico media parte de los efectos beneficiosos del ejercicio (Carro et. al. 2000; Carro et. al. 2001) en enfermedades neurodegenerativas y tras daño cerebral (Benarroch 2012; Carro et. al. 2002). Sin embargo, el IGF-I circulante no parece tener un impacto significativo durante el desarrollo (Sjögren et. al. 1999; Liu JL et. al. 1998). En humanos, y en general en mamíferos, los niveles de IGF-I en suero incrementan en la pubertad y disminuyen con la edad (Vitale et. al. 2012). Además se han asociado tanto niveles bajos de IGF-I circulantes como de su señalización, con cambios en la función del cerebro (Busiguina et. al. 2000; Laviola et. al. 2008).

Factores que afectan las concentraciones de IGF-I circulante

Directos	Indirectos	Otros
Hormona del crecimiento	Edad	Zinc
Consumo de proteínas y dieta calórica	Grasa corporal	Hormona paratiroidea
<i>Estresores catabólicos</i>		
Enfermedades		
Sepsis	Estrogenos	Proteína relacionada a la Hormona tiroidea
Trauma		
Anorexia/bulimia nerviosa		
Hormonas tiroideas	Androgenos	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Insulina	Ejercicio	Citocinas inflamatorias
Unión de la subunidad ácido lábil (ALS) con IGFBP-3/IGF-I		

Tabla1 Principales factores que alteran los niveles de IGF-I en suero. Modificada de Rosen y Pollak 1999

Hay dos tipos de células especializadas implicadas en la entrada de IGF-I periférico al cerebro a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad(LRP); el endotelio de la barrera hematoencefálica y el epitelio que conforma la barrera funcional del plexo coroideo (Carro et. al.. 2005). La barrera hematoencefálica está formada por interacciones entre células endoteliales mediante uniones estrechas, los astrocitos que rodean a los vasos sanguíneos y que conectan con terminales neuronales, y los pericitos (Hawkins y Davis 2005). Esta barrera permite una permeabilidad selectiva, regulando el equilibrio iónico y molecular a través de transportadores selectivos y multitud de receptores especializados (Banks y Kastin, 1985; Neuwelt et. al. 2011). Esta barrera es de vital importancia; así, su mal funcionamiento esta frecuentemente asociado a enfermedades neurodegenerativas o cerebrovasculares (Zlokovich 2008).

El paso de IGF-I sérico a través de la barrera hematoencefálica es promovido por el ejercicio (Carro et. al. 2000; Duman et. al. 2009; Carro et. al. 2001) y la actividad cerebral (Nishijima et. al. 2010). Uno de los mecanismos propuestos por el cual el IGF-I atraviesa la barrera hematoencefálica (Figura 2) es el “acoplamiento neurotrófico” que se inicia por la liberación de prostaglandina E2, derivados de Acido Araquidónico, y ATP en respuesta al glutamato procedente de la actividad sináptica. Estos mediadores estimulan la actividad de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP9), la cual corta IGFBP3, resultando en la liberación de IGF-I, y facilitando su unión a los receptores de IGF-I y LRP1 para su posterior transporte desde el lumen hacia el parénquima cerebral, donde el IGF-I es captado por los astrocitos o neuronas adyacentes (Nishijima et. al. 2010). Esto puede sugerir que el paso de IGF-I a través del endotelio es fundamentalmente dependiente de la actividad del cerebro (Torres-Aleman, 2010).

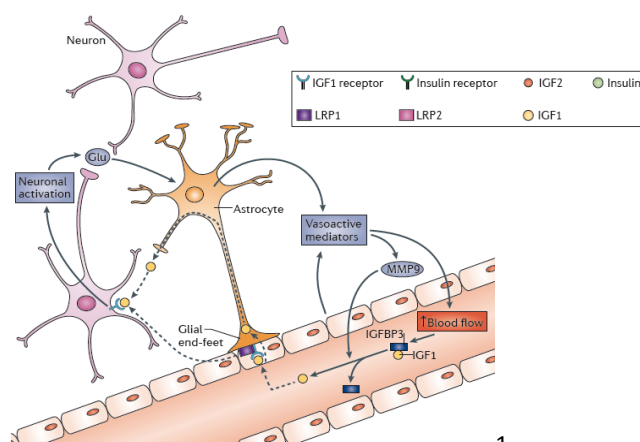


Figura 1 Acoplamiento neurotrófico de la entrada de IGF-I sérico al cerebro a través del endotelio cerebral por neuronas activas (Figura tomada de Fernández y Torres-Aleman 2012).

El receptor de IGF-I (IGF-IR)

El IGF-I puede unirse a específicamente a tres diferentes receptores (IGF-IR, IGF-IIR, IR) pero con diferente afinidad para cada uno, siendo el IGF-IR el principal receptor de IGF-I aunque, IGF-II e Insulina también pueden unirse a IGF-IR pero con menor afinidad (Annunziata et. al. 2011). La capacidad del IGF-I de interaccionar, con su receptor depende lógicamente de los niveles de IGF-I libre, que a su vez dependen de la capacidad de separarse de las IGFBPs en la proximidad del receptor. La liberación del IGF-I depende en gran medida de la actividad de distintas proteasas de IGFBPs (Revisado de Frystyk 2009).

El IGF-IR es una proteína ubicua, particularmente en el sistema nervioso central tiene una alta expresión durante el desarrollo y disminuye en la adultez, pero permanece relativamente alto en plexo coroideo y meninges (Russo et. al. 2005). Tiene una estructura tetramérica transmembrana con dos subunidades alfa (extracelular) a la que se une el IGF-I y dos subunidades beta (transmembrana e intracelular) que tienen actividad tirosina quinasa. Ambas subunidades se hallan unidas por puentes disulfuro (Gronborg et. al. 1993). El receptor sufre un procesamiento postraducciona en el retículo endoplasmático (forma madura) antes de expresarse en la membrana plasmática (Adams et. al. 2000). Este receptor puede además formar un heterotetramero funcional con el receptor de Insulina, que consiste en una cadena alfa y una cadena beta del receptor de IGF-I y una cadena alfa y una cadena beta del receptor de Insulina (Belfiore et. al. 2009). Este híbrido ha sido identificado en varias células (Gatenby et. al. 2013), aunque su función biológica todavía no es clara.

Señalización de IGF-I mediada por su receptor

Cuando el IGF-I se encuentra biodisponible y por lo tanto puede unirse a su receptor se produce de forma rápida la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1). El IRS-1 fosforilado a su vez desencadena una cascada de señalización que activa por un lado las vías de la quinasa regulada por señales extracelulares/proteína quinasa activada por mitógenos (ERK/MAPK) y por otro la fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) (revisado por Fernández & Torres-Alemán, 2012). Estas vías de señalización tienen una gran variedad de implicaciones por su

habilidad de promover la síntesis de proteínas, activación e inactivación enzimática, expresión génica y tráfico de vesículas, entre otros (Saltiel et. al. 2001).

Estradiol e IGF-I

La existencia de una interacción entre IGF-I y estradiol se ha demostrado en el cerebro por distintos métodos. Por ejemplo, la administración de antagonistas específicos que producen un bloqueo de los receptores de IGF-I como el JB-1, inhibe los efectos neuroprotectores de estradiol. Igualmente, los efectos neuroprotectores de IGF-I también se ven reprimidos al administrar el antagonista del ER; ICI 182,780 (Azcoitia et. al. 1999); estos efectos pueden estar relacionados con la disminución de ER alfa en presencia del antagonista del receptor de IGF-I y de IGF-IR con el inhibidor ICI182,780 observados en hipocampo (Cardona-Gomez et. al. 2001). Otro ejemplo de la interacción de IGF-I y estradiol se ha descrito en hembras ovariectomizadas donde estradiol incrementa los procesos cognitivos, pero cuando se bloquea la señalización de IGF-I en el cerebro, se pierde el efecto de estradiol (Witty et. al. 2013). La pérdida del efecto de estradiol probablemente se deba a que el IGF-I es capaz de modular la acción del ER, como se ha demostrado en la línea celular de neuroblastoma Sk-ER3 (Ma et. al. 1994), Por ejemplo, IGF-I utiliza la vía ERK/MAPK para mejorar la actividad del ER α en ausencia de estradiol (Patrone et. al. 1998), y usa la vía PI3K/Akt para disminuir la actividad del ER α en presencia de estradiol (Méndez et. al. 2006). Adicionalmente, el estradiol es capaz de controlar la señalización de IGF-IR activando las vías de ERK/MAPK (Cardona-Gómez et. al. 2002).

En cuanto a sus respectivos receptores, hay indicios de una regulación cruzada de la expresión de IGF-IR y ER (Stoica et. al. 2000). En el cerebro de rata, la actividad del estradiol y del ER puede ser modulada por la expresión del IGF-IR, y a su vez, la actividad del IGF-IR puede controlar la expresión del ER (Cardona-Gómez et. al. 2001). Por otro lado en estudios in vitro se ha reportado que la interacción entre estos receptores promueve efectos protectores y reduce la toxicidad por A β (Chen et. al. 2013). Además al estudiar más detalladamente los receptores en la membrana se encontró que ER α es capaz de asociarse con IGF-IR y PI3K formando complejos multimoleculares transitorios (Mendez et. al. 2003). Por lo tanto esta interacción entre las dos vías puede tener implicaciones en varias funciones del sistema nervioso central

como: el estado de ánimo, miedo, ansiedad, depresión, cognición y memoria en humanos y animales de laboratorio porque estradiol juega un papel importante en estas funciones (Oyola et. al. 2012).

Ejercicio Físico e IGF-I

Multitud de estudios han demostrado que el ejercicio físico modula la fisiología y la conducta. Estos cambios tienen efectos beneficiosos en gran parte de los órganos del cuerpo; entre ellos el cerebro, por ejemplo el ejercicio mejora la memoria, la cognición (Roig et. al. 2013 y McDonnell MN et. al. 2011) y el estado de ánimo (Archer et. al.2014; Rethorst y Trivedi, 2013;), constituyendo un potencial enfoque terapéutico en desordenes de ansiedad y depresión (Carek 2011). En respuesta al ejercicio el cerebro y el cuerpo mejoran su funcionalidad y resistencia ante la exposición de un estrés (puntual) agudo; esto se traduce en una respuesta fisiológica adaptativa que facilita la reacción de lucha o huida. Si el estrés es crónico o severo, la resistencia es abolida, resultando dañados el cuerpo y el cerebro (Thompson et. al. 2014).

La importancia de realizar ejercicio físico como factor neuroprotector se ha reportado desde hace ya bastante tiempo. Por ejemplo, durante los últimos 10 años se ha reportado en numerosas ocasiones que el ejercicio físico constituye una alternativa clínica efectiva en enfermedades neurodegenerativas, atenuando o limitando su progresión, incluso síntomas depresivos y mortalidad (Paillard et. al. 2015). Además, en un estudio reportaron que la inactividad física está relacionada con entre el 12 -20% de casos de Enfermedad de Alzheimer en el mundo (Norton et. al. 2014).

En la literatura abunda que los efectos beneficiosos del ejercicio son mediados por factores tróficos. Esto ha dado origen a la hipótesis neurotrófica, una de las hipótesis más populares para explicar los efectos beneficiosos de realizar una actividad física; esta hipótesis sugiere que el ejercicio facilita la producción de factores neurotróficos que tienen efectos antidepresivos, neuroprotectores, incrementan la plasticidad neuronal y el aprendizaje además de modular el estado de ánimo (revisado por Duman 2005). El IGF-I sería uno de los principales factores, junto con BDNF y VEGF, que median los efectos beneficiosos del ejercicio en el cerebro (Carro et. al.. 2000; Cotman et. al. 2007). Dependiendo de la duración y de la intensidad del ejercicio pueden verse modificados los niveles de IGF-I circulante en suero (revisado en Nguyen et. al. 1998; Majorczyk y Smolag 2016) Y aunque hay estudios en los que no hay cambios de IGF-I en suero

después de realizar ejercicio físico, se ha demostrado que el ARNm de IGF-I incrementa en el musculo esquelético (Hambrecht et. al.. 2005), Además, el ejercicio físico estimula la entrada de IGF-I circulante al cerebro por el incremento del flujo sanguíneo inducido por el ejercicio (Carro et. al.. 2000). Por otra parte se ha reportado que una inyección intraventricular de IGF-I es capaz de inducir los mismos efectos antidepresivos y ansiolíticos en ratones que el IGF-I circulante; es más, al administrar un anticuerpo anti-IGF-I se bloquea el efecto ansiolítico del ejercicio en ratones adultos (Trejo et. al. 2008). Estos datos sugieren que el IGF-I puede tener un papel mediador de los efectos del ejercicio en el estado de ánimo.

Es bien conocido que la GH estimula la secreción de IGF-I. En este sentido, es importante señalar que la relación entre la intensidad del ejercicio físico y la secreción de GH está más pronunciada en las mujeres que en los hombres (Pritzlaff-Roy et. al. 2002), pero en cuanto a la duración del ejercicio está más pronunciada en hombres que en mujeres (Wideman et. al. 2006). Por lo tanto es de esperar que los niveles de IGF-I en respuesta a ejercicio se modifiquen dependiendo del género. También se ha reportado que hay diferencias en los efectos beneficiosos del ejercicio en el cerebro dependiendo del genero (Baker et. al. 2010), pero poco se ha profundizado al respecto. Asimismo, no se han analizado suficientemente las posibles diferencias sexuales del efecto del ejercicio en el estado de ánimo. En hembras (mujeres) este aspecto esta inconcluso debido a que la mayoría de los estudios son en machos (hombres) y a la disparidad de los resultados reportados.

El IGF-I en la mediana edad

La menopausia es un gran cambio endocrino para las mujeres de mediana edad. Esta etapa es crucial porque cursa con una disminución de hormonas importantes para mantener un estado saludable, tales como los estrógenos (Morrison et. al. 2006) GH (Russell-Aulet et. al. 2001) e IGF-I (Gambera et. al. 2004). Tanto GH como IGF-I comienzan a disminuir en la adultez llegando a niveles mínimos después de los 60 años de edad, a este fenómeno se le conoce como somatopausa (Junnla et. al. 2013). Además las mujeres son más vulnerables a diversas enfermedades como aterosclerosis, algunos tipos de cáncer, osteoporosis, demencia senil (revisado de Chung et. al. 2009), Alzheimer (Rettberg et. al. 2016), y trastornos del estado del ánimo (Yazdkhasti et. al. 2015).

Actualmente se postula que la disminución de la señalización de Insulina/IGF-I está asociada al incremento de esperanza de vida (Fontana et. al. 2010; Ziv & Hu, 2011); sobre todo en hembras, pero esto está asociado a un incremento de resistencia a insulina (revisado por Junnila et. al. 2013) Comúnmente se ha relacionado la resistencia a Insulina con enfermedades metabólicas como Diabetes tipo 2 y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, lo que conlleva una peor calidad de vida. Pero se ha reportado que durante la menopausia, aun encontrándose bajos los niveles de estrógenos, estos son capaces de regular la GH en la glándula pituitaria específicamente a través de los receptores alfa de estrógenos (Veldhuis et. al. 2016) y muy probablemente IGF-I se vea implicado en esta regulación.

Aunque se ha reportado que el tratamiento con estrógenos en mujeres postmenopausicas no altera el eje GH-IGF-I, por lo que se considera que los cambios en este eje se deben sólo al envejecimiento y no a las hormonas ováricas (Bellantoni et. al. 1996), nuevas evidencias apuntan que la desregulación del eje de IGF-I puede comenzar en la mediana edad (Zhao et. al. 2016) justo cuando empiezan a disminuir las hormonas gonadales, por lo cual este cambio puede estar modificando la respuesta del eje de IGF-I ante estradiol. Entonces los cambios sufridos en la mediana edad pueden estar relacionados con el fracaso de los tratamientos hormonales durante la postmenopausia tanto con IGF-I (Friedlander et. al. 2001) como de estradiol (Henderson et. al. 2016).

El IGF-I y los estrógenos están involucrados en el mantenimiento de una buena calidad de vida. Por eso es necesario investigar más a fondo los mecanismos desregulados de estas dos hormonas en esta etapa, para mejorar la calidad de vida de las mujeres de mediana edad.

Enfermedad de Alzheimer e IGF-I

Con el incremento de la esperanza de vida se espera un rápido crecimiento de la población envejecida en todo el mundo. Según cálculos estadísticos, para el año 2050 serán cerca de 1500 millones de personas ancianas a nivel mundial, que probablemente estén en riesgo o padezcan alguna enfermedad neurodegenerativa como la enfermedad de Alzheimer (Campos et. al. 2016).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia senil que cursa con deterioro cognitivo y neurodegeneración. Debido a su complejidad y a los múltiples factores que

están relacionados con ella, se han propuesto diversas hipótesis para tratar de explicar la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. En la literatura se encuentran las siguientes hipótesis: amiloidea, tau, inflamación, estrés oxidativo, vascular, colesterol, ciclo celular, neurotransmisores y la hipótesis de la señalización de insulina. Nuestro trabajo está enfocado en el estudio de la posible relación entre IGF-I, las hormonas ováricas y la EA, porque se ha demostrado que insulina e IGF-I participan en el aclaramiento de A β estimulando su liberación en neuronas e incrementando la concentración de A β en líquido cefalorraquídeo (LCR). Existen distintos datos que apuntan a que durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer los niveles de IGF-I en suero se modifican. Hay datos que indican que están disminuidos mientras que otros indican lo contrario. Probablemente esto se deba a que se han evaluado en distintas fases de la enfermedad (de Brujin et. al. 2014). En todo caso, de forma indirecta, esto sugiere que existe una alteración en la señalización de IGF-I, quizás causada por los altos niveles de A β que antagonizan la unión de IGF-I a sus receptores, lo que conlleva a una acumulación de A β y resistencia a IGF-I (Carro et. al. 2004). Algo similar se postulo en este laboratorio que ocurre con la señalización mediada por insulina, tal como se ha corroborado en rodajas de hipocampos de cerebros de pacientes con EA donde se ha visto una menor respuesta a Insulina e IGF-I (Talbot et. al. 2012) Pero en etapas tempranas de la enfermedad de EA se ha reportado que los niveles de IGF-I en suero se encuentran bajos comparado con personas control (Westwood et. al. 2014), lo que puede estar reflejando una resistencia a IGF-I en el cerebro. Dado que el IGF-I está implicado en la regulación del estado de ánimo (poner referencias), su disrupción en EA podría explicar, al menos en parte, las conocidas asociaciones mórbidas entre estado de ánimo alterado y demencia. Sin embargo, aun no se ha analizado la posible implicación de la disrupción de eje de IGF-I y el estado de ánimo en la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es:

Analizar las diferencias de genero usando el ejercicio físico como modulador de IGF-I y del estado de animo.

Objetivos especificos

Determinar si el ejercicio fisico modula el estado de animo dependiendo del genero.

Determinar el papel del IGF-I en esta posible modulacion

Analizar la posible implicacion de hormonas sexuales

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos y hembra C57/BL/6j (Laboratorios Harlan), ratones hembra transgénicos LID (Liver-specific IGF-I deficient) con peso entre 18-21 g, con 8 semanas de edad al inicio del experimento, y ratones hembra APP/PS1 doble transgénicos que expresan la isoforma humana mutada de beta amiloide y la mutación de Presenilina 1 humana (Hsiao et. al., 1996, Duff et. al., 1996) como modelo de la enfermedad de Alzheimer; con peso entre 28-30 g, de 8 y 9 meses de edad al inicio del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz (ciclo de luz/oscuridad 12:12, inicio de la luz 7 a.m.) y temperatura (22°C), acceso libre a comida y agua. Habitaron en las instalaciones de animalario del Instituto Cajal (CSIC, Madrid) y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética Local. Fueron alojados en grupos de 5 animales en jaulas estándar de polipropileno (45x28x20 cm²) (48x26 cm²).

Ratones LID

El grupo de LeRoith generó esta cepa basándose en el sistema Cre/loxP para evitar la letalidad perinatal. Cruzaron la línea de ratones que tienen el gen *igf1* flanqueado por las secuencias LoxP, y la línea que expresa cre recombinasa bajo el control del promotor de albumina, como resultado se obtuvo una cepa con el gen de *igf1* delecionado específicamente en hígado (Liu JL et. al. 1998). Se caracterizan por tener bajos los niveles circulantes de IGF-I aproximadamente el 75%, sin afectar su crecimiento. (Liu JL et. al. 2000) además muestran un incremento en los niveles de la hormona del crecimiento e insensibilidad a insulina en músculo, hígado y tejido adiposo (Haluzik M. et. al. 2003). También presentan alteraciones en la memoria y aprendizaje espacial (Trejo et. al. 2008) se usaron entre 8-10 ratones por grupo.

Ratones APP/PS1

Desde los años noventa se han desarrollado modelos en ratón para estudiar la enfermedad de Alzheimer. Estos modelos presentan diversas características de la patología de la enfermedad de Alzheimer. (Hsiao, 1998). El grupo trabaja con la cepa mutante desarrollada por P. Mouton del NIH (que amablemente nos cedió), Esta cepa de ratones son doble transgénicos, resultado del cruce de una línea con la mutación Swedish (K670N/ M671L) en la proteína precursora amiloide, y la línea que tiene el gen

PS1 truncado con una delección en el exón 9 (Savonenko et. al., 2005). Se caracteriza por el gran acumulo de placas en el cerebro, con déficit cognitivo en memoria de reconocimiento (NOR) y memoria espacial de referencia (RAWM), con una acelerada progresión de la enfermedad, con marcados efectos durante el envejecimiento (Webster et. al.; 2013).

Ovariectomía

Todos los procedimientos fueron realizados en quirófano bajo condiciones de esterilidad. Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (50 mg/kg) y xylazina (4.5 mg/ml). Antes de iniciar la cirugía se aplico gel para proteger los ojos. Se afeitaron los ratones en la zona de la cresta iliaca, se desinfectaron con etanol al 70%, y con una hoja de bisturí se realizo una pequeña incisión en la piel del ratón (1-2 cm). Se localizo uno de los ovarios haciendo presión en el abdomen; una vez encontrado, se corto la fascia adyacente y con unas pinzas lentamente se expuso el ovario, se ligo con hilo absorbible, y posteriormente se extirpo. Este procedimiento se repitió con el otro ovario. Se suturo la herida con hilo de seda trenzado y se dejo recuperar al ratón en una jaula con una temperatura de 25-27°C hasta que despertó completamente de la anestesia. Como control, los ratones se sometieron a una cirugía simulada siguiendo el mismo procedimiento sin disecar los ovarios. Se realizaron experimentos con estos ratones 1 mes post-cirugía para evitar el efecto remanente de los estrógenos.

Infección in vivo de endotelio cerebral de ratón con partículas lentivirales vía carótida

La inyección se realizo dos semanas antes del ejercicio forzado. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y flujo de oxígeno 0.8-1l/min. Durante toda la cirugía se mantuvo la temperatura del ratón con una manta eléctrica a 25°C, Para proteger los ojos se aplico gel, se corto la piel y musculo del ratón en la línea media desde el hueso manubrio hasta la tráquea para exponer la carótida común con la ayuda de una espátula. Posteriormente se ligo en la parte inferior de la carótida común para evitar la hemorragia, y la carótida común externa para asegurar que todo el volumen inyectado llegue directamente al cerebro. Se inyectaron 50 µL de la suspensión del virus (4.3×10^{10} pfu/ml) a una velocidad de 3 µL/min usando el nano inyector Nanomite Syringe Pump MAI 70-2217 (Harvard Apparatus) y una jeringa Hamilton de 100 µL acoplada a una

cánula hecha con tubo de polietileno (0.28mm x 0.61mm x2cm + 0.58mm x 0.965mm x 13cm). La cánula se inserto en la arteria común. Los ratones se mantuvieron en una jaula a temperatura de 25-27°C hasta que se recuperaron completamente de la anestesia. Durante la recuperación pos-cirugía, los ratones no mostraron signos de alteraciones motrices, o en el consumo de agua y comida.



Figura 3 Imagen de la canulación para inyección intracarótida.

Tratamiento con MPP, antagonista específico del Receptor de Estrógeno α

Los ratones hembras fueron divididos en dos grupos aleatoriamente y posterior mente inyectados vía intraperitoneal con Metil-Piperidino-Pirazol (MPP, Tocris, Ellisville, MO). La concentración usada, así como el régimen de tratamiento, fue adaptado del protocolo descrito por otros autores (Santollo, 2009). Se administro 0.1 ml cada cuatro días de MPP y Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) como vehículo. La dosis fue de 0.052g/Kg. Las inyecciones de MPP/DMSO fueron administradas después de estar en la cinta de correr, entre 12 p.m. y 3 p.m. para evitar que la inyección afecte al desempeño durante el entrenamiento.

Tratamiento con PPT, agonista específico del Receptor de Estrógeno α

A un grupo de ratones hembras de mediana edad se administro Propil Pirazol Trisfenol (PPT, Tocris, Ellisville, MO) diluido en aceite de maíz (SIGMA). La dosis fue 1mg/Kg fue administrada por vía subcutánea después de realizar ejercicio cada dos días durante dos semanas,

Entrenamiento en cinta de correr

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: ejercitado y sedentario. Se sometieron a entrenamiento crónico o agudo en la cinta de correr bien 5 días a la semana durante 2 semanas, o bien 1 día durante 40 minutos a 12 metros/minuto. Los grupos sedentarios permanecieron en la cinta de correr sin activar. El análisis de conducta fue determinado un día antes de iniciar la habituación a la cinta de correr y un día posterior al finalizar el ejercicio físico. Todos los ratones fueron familiarizados a la cinta de correr (Letica, Italia) dos días antes de empezar el entrenamiento (corriendo durante 5 minutos a 0,1 m/s y luego 10 minutos a 0,2 m/s) para minimizar el estrés por exposición al aparato. Todo el procedimiento se llevó a cabo en la misma sala. No se usó ningún choque eléctrico en la cola u otro método para obligarles a correr. El horario de las sesiones fue entre las 9:00 y 12:00 p.m. para homogenizar la influencia de los ritmos circadianos y el estado de ánimo (Andreolini et. al., 1999). Tras la última sesión de ejercicio o prueba de conducta los ratones fueron sacrificados



Figura 4 Cinta de correr (Letica, Italia)

Análisis del comportamiento

Todos los ratones se habituaron a todas las salas durante 30 minutos o una hora antes de realizar cualquier prueba o test de conducta.

Laberinto en cruz elevado (EPM)

Esta prueba se uso para evaluar la ansiedad en roedores (Lister, 1987). El laberinto es una plataforma elevada (40 cm del suelo) que consiste en cuatro brazos en forma de cruz conectados por un cuadrado central, dos abiertos uno en frente del otro y dos cerrados con igual disposición (0.5 cm ancho).

La prueba inicio colocando a los roedores en el centro de la estructura, con la cabeza en dirección a un brazo abierto y opuesta al experimentador; durante 5 minutos se les permitió explorar libremente la plataforma, Se descartan los roedores que no realizan ningún movimiento durante la prueba o que se caen continuamente de la plataforma. No se descarto ningún ratón en esta prueba. El laberinto se limpio después de que cada ratón finalizo la prueba para eliminar rastros de olores.

El comportamiento de los ratones fue grabado en video y analizado después utilizando el software Video Tracking Plus Maze Mouse (Med Associates, USA) que indica el tiempo de permanencia y el número de exploraciones en las distintas zonas del laberinto. Los datos son presentados como el tiempo total permanecido en brazos abiertos (TBA). El test se llevó a cabo 24 horas después de la última vez que corrieron para evitar los efectos del entrenamiento en los niveles de actividad basal (Duman et. al., 2008).

Resistencia a estrés

Tres días antes de iniciar el entrenamiento en la cinta para correr, los ratones fueron expuestos una vez a natación forzada y un día después de finalizar el entrenamiento se uso la prueba de suspensión por la cola para medir la capacidad de recuperación al estrés y evitar el componente de familiarización de los ratones a la prueba de nado forzado. Las pruebas se realizaron de la siguiente forma:

Prueba de Nado Forzado (FST)

Como agente estresante, usamos la natación forzada para producir un estrés agudo muy fuerte, porque es capaz de inducir un comportamiento depresivo, mediante desesperanza aprendida (inmovilidad); la prueba consiste en una sola sesión donde los ratones son forzados a nadar en un cilindro sin escapatoria.

Los ratones fueron introducidos de 4 en 4 en cilindros de metacrilato llenos de agua a 23°C, separados por cartulinas, durante 6 minutos; pero solo se analizaron los últimos 4 minutos, se grabaron en video las sesiones para su posterior análisis. Se contabilizo el tiempo de movilidad y se restó del tiempo total de la prueba, para obtener el tiempo de inmovilidad. Aunque medir la inmovilidad en esta prueba no es el objetivo, esta información sirve como indicador de susceptibilidad a depresión.

Prueba de Suspensión por la cola (TST)

Esta prueba, al igual que la natación forzada, produce un estrés agudo donde el tiempo de inmovilidad se considera como indicador de depresión. Los ratones fueron colgados por la base de la cola y boca abajo a una distancia de 30 cm del suelo. Se grabo la sesión con una duración de 6 minutos, se contabilizo el tiempo de movilidad y se resto del tiempo total de la prueba, para obtener el tiempo de inmovilidad. La eficacia antidepressiva del tratamiento se mide por la disminución significativa del tiempo de inmovilidad.

Evaluación de la actividad

Medimos la actividad de los ratones para descartar el posible efecto estimulador del ejercicio físico en la prueba de suspensión por la cola. Para medir la actividad de los ratones usamos la caja de actividad, esta caja dispone de fotocélulas, que emplea barreras de haces infrarrojos permitiendo la detección de movimiento automáticamente mediante el software Versamax (Accuscan Instruments,Trabue,Ohio) y el análisis de los datos con el programa Versadata (Accuscan Instruments, Trabue, Ohio).

Se ha descrito que 5 minutos es suficiente para analizar la actividad motora; además proporciona datos sobre la ansiedad de los roedores al medirse su comportamiento en campo abierto (Bailey KR. 2009). Se introdujeron dos ratones por actímetro (40x40x30 cm) cada ratón en un cuadrante de 20x20 cm durante 10 minutos, se analizaron los primeros 5 minutos. Para evaluar la actividad se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: actividad horizontal, vertical y distancia total.

Prueba del estado de Alerta

Los ratones fueron expuestos a una serie de estímulos sensoriales como lo describe Easton et. al. 2004, en el siguiente orden:

Olfativo: Se expuso en grupos de 5 ratones a benzaldehído (10 ml) durante 20 segundos y posteriormente se midió su actividad en el actímetro.

Táctil: Se colocaron los ratones en los actímetros sin activar y a continuación se les dio un estímulo de aire comprimido a una distancia de 10 cm durante 2 segundos y después se activo el actímetro.

Vestibular: Se colocaron los ratones en grupos de 5 sobre un agitador orbital a 90 rpm durante 8 segundos y subsiguientemente se colocaron en los actímetros para medir su actividad.

Los valores basales fueron adquiridos un día antes de la primera exposición a la cinta para correr, y 30 minutos después de realizar ejercicio físico. El primero de los estímulos se proporcionó con intervalos de 15 ± 5 minutos entre los siguientes estímulos. La respuesta de alerta fue medida por el incremento de actividad horizontal, vertical y distancia total en los actímetros durante 10 minutos para cada estímulo. Los datos fueron obtenidos por el programa Versamax (Accuscan Instruments, Trabue, Ohio) y analizados con el programa Versadata (Accuscan Instruments, Trabue, Ohio).

Recolección de muestras

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital (50-100 mg/kg), se extrajo la sangre por punción cardiaca antes de iniciar la perfusión intracardiaca con 50 ml de solución salina (NaCl 0.9%) por ratón; a continuación se extrajo el cerebro e hígado; el cerebro se disecciono en cortezas, hipocampos y cerebelo. Inmediatamente se introdujeron en hielo seco y posteriormente se guardaron a -80°C hasta su uso.

Para el estudio de histoquímica, además de usar solución salina, se perfundieron con 30 ml de paraformaldehído 4% (PFA). Se procedió a la extracción del cerebro y se fijo por inmersión durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se lava tres veces con tampón fosfato 0.1 N y se guardó a 4°C con azida al 0.02% en tampón fosfato 0.1N hasta su uso.

La sangre se dejo coagular durante 2 horas a temperatura ambiente y fue centrifugada a $2000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Al finalizar la centrifugación se recogió el suero y se guardo a -20°C hasta su uso.

Cultivo primario de endotelio cerebral de rata y ratón (RBEC y MBEC)

El cultivo de células endoteliales de cerebro se realizó siguiendo el protocolo descrito (Nishijima et. al., 2010) a partir de ratas de 5-7 días de edad. Tras seccionar la cabeza y sumergirla brevemente en etanol al 70%, se diseccionó el cerebro, cogiendo solamente las cortezas y el hipocampo, mientras se encontraba sumergido en EBSS (Gibco, Life Technologies, Alcobendas, España). El tejido se disgregó, primero mecánicamente con una cuchilla, y a continuación se introdujo en un tubo de 50 ml con medio enzimático: DNAsa (10 U/ml), Dispasa (0.1%, Roche) y Colagenasa II (270 U/ml, Gibco), Dulbecco's modified Eagle's medium sin rojo fenol (DMEM F-12, Gibco). Posteriormente se incubó durante 1h 30 minutos en agitación a 280 rpm. Tras esto, se añadió Suero Fetal Bovino (Gibco) para detener la reacción enzimática y la suspensión tisular se pasó a través de una aguja de 20G 4 veces. El tejido homogeneizado se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm, y el pellet se resuspendió en medio de selección para células endoteliales conteniendo Hidrocortisona (1 µg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y Puromicina (3 µg/ml, Sigma) disueltas en medio libre de suero para endotelio humano (HE-SFM, Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino (Gibco) y antibiótico/antimicótico (Gibco). Las células se sembraron en frascos de 75 cm² o placas de 6-12 pocillos previamente incubados con una matriz que contiene Colágeno tipo IV (2.5 µg/cm² Sigma) y Fibronectina (0.5 µg/cm², Sigma) diluidos en agua estéril, durante al menos una hora y lavados con EBBS.

Tras 24 horas el cultivo se lavó con Tampón Fosfato (PBS) y se añadió medio de selección. 48 horas después se cambia a medio completo: Hidrocortisona (1 µg/ml), extracto de cerebro de vaca (0.1 mg/ml), Factor de crecimiento de fibroblastos β (bFGF, 2 ng/ml, Sigma) disuelto en DMEM F-12 sin rojo fenol suplementado con FBS al 20%. Tras 5-7 días de incubación a 37°C y en un 5% CO₂, cuando los cultivos formaron una monocapa, se utilizaron para transfecciones o tratamientos hormonales.

El cultivo endotelial de ratón se obtuvo de la misma forma, haciendo adaptaciones en las concentraciones de enzimas y antibiótico; en el medio enzimático: DNAsa (7 U/ml), Dispasa (0.04%) y Colagenasa II (120 U/ml) y en el medio de selección: Puromicina (1,2 µg/ml).

Cultivo primario de plexo coroideo de rata

La disección del cerebro fue la misma descrita en el cultivo de endotelio, se extrajeron los ventrículos laterales además del tercero y cuarto ventrículo de ratas posnatales p7-9. El tejido fue digerido enzimáticamente con Pronasa (Sigma) 1 mg/ml en PBS por 25 minutos a 37°C en agitación constante, Se dejó decantar el tejido y se añadió ADNasa I (Sigma) 12.5 µg/ml en PBS por 5 minutos a 37°C en agitación. Se disgregó mecánicamente varias veces con una pipeta Pasteur con la boca de la punta más estrecha; se decantaron las células y se desechó el sobrenadante. Después las células se lavaron con PBS y se reincubó con ADNasa I a la misma concentración en PBS por 5 minutos en agitación a 37°C, y se continuó con la disgregación mecánica. Finalmente las células se pasan a través de un filtro de membrana de nilón con un poro de 70 µm de diámetro a un Falcón de 50 ml. Se lavó tres veces por centrifugación (1000 rpm) con PBS. El precipitado se resuspendió en DMEM-F12 suplementado con Suero Fetal Bovino al 10%, y se sembró en placa petri (Sterilin) por 2 horas a 37°C (durante este tiempo las células del plexo coroideo no se adhieren a la placa). Después el sobrenadante se recuperó y suplementó con 10 ng/ml de EGF (Sigma), 5 ng/ml de bFGF (Sigma). Las células se sembraron a una densidad de 150.000 por pocillo en placa de 12 pocillos previamente recubierta con Laminina (Sigma, 10 µg/ml durante 2 horas a 37°C).

Ensayo de internalización de IGF-I biotinilado (bIGF-I)

El ensayo de la captura de IGF-I en células endoteliales y de plexos coroideos se realizó al formar una monocapa de células. Las células se ayunaron durante 3 horas con DMEM F-12 sin rojo fenol y sin suero fetal bovino. A continuación se pre-trataron e incubaron durante 2 horas con 17β-estradiol (Sigma) 10⁻⁹M y/o antagonistas específicos para los receptores de estrógenos alfa (MPP, 10⁻⁸M, Tocris) y beta (PHTPP, 10⁻⁷M, Tocris). Transcurrido ese tiempo, se añadió bIGF-I a una concentración final de 0.2 µg/ml, y se incubó durante 1 hora. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C. Posteriormente las células se colocaron en hielo, se lavaron una vez con PBS pH 6.0 para eliminar el péptido unido a membrana, y después 2 veces con PBS pH 7.4 para reponer el pH. Después se incubaron en tampón de lisis durante 10 minutos a 4°C, para

extraer las proteínas. Las muestras fueron diluidas en tampón Laemmli y analizadas por WB. En el gel se utilizó un carril con bIGF-I diluido en Laemmli como control interno.

Transfecciones

Se desechó el medio de las células cultivadas y se lavaron una vez con PBS pH 7.4. Se añadió tripsina, dejando actuar durante un minuto a 37°C; a continuación, se neutralizó la reacción con medio de cultivo que contiene suero fetal bovino al 10%. Las células fueron contadas con cámara de Neubauer y centrifugadas a 100x g durante 10 minutos. Para cada condición de electroporación se usaron dos millones de células. El precipitado celular fue resuspendido en 100 µl de solución de electroporación (Ingenio, Mirus, USA) y 2 µg del DNA que se quiere introducir. Como control, unas células fueron electroporadas con una secuencia aleatoria inespecífica, o con un plásmido que contiene el gen de GFP. Se usó el programa M003 del Nucleofector Amaxa (Lonza). Inmediatamente después se añadieron 500 µl de medio a la cubeta y se trasladó la mezcla a una placa previamente incubada con Poli-L-lisina (Sigma). 48 h después del procedimiento se observaron las células en el microscopio de fluorescencia para comprobar la eficiencia de transfección. Entre 5-7 días después se lisaron para analizar la expresión de proteínas por Western Blot.

Reactivos	Uso	Concentración	Casa comercial
bIGF-I	Captura de IGF-I	0.2 µg/ml	Ibt systems
Estradiol	Captura de IGF-I	10 ⁻⁹ M	Tocris
MPP	Captura de IGF-I	10 ⁻⁸ M	Tocris
PHTPP	Captura de IGF-I	10 ⁻⁸ M	Tocris
PPT	Captura de IGF-I	10 ⁻⁸ M	Tocris
DPN	Captura de IGF-I	10 ⁻⁹ M	Tocris

Tabla 2 IGF-I, agonistas y antagonistas específicos de receptores de estrógenos empleados.

Producción de partículas lentivirales.

Plásmido ERE-GFP

El promotor CMV del vector pLKO-eGFP fue sustituido mediante restricción enzimática por el promotor ERE del plásmido que contiene 3 secuencias repetidas de elemento de respuesta a estrógeno (3xERE-TATA luc de AddGene,USA), a continuación se generaron clones y se obtuvo un plásmido (pLKO-ERE-eGFP) con los características necesarias para generar partículas lentivirales.

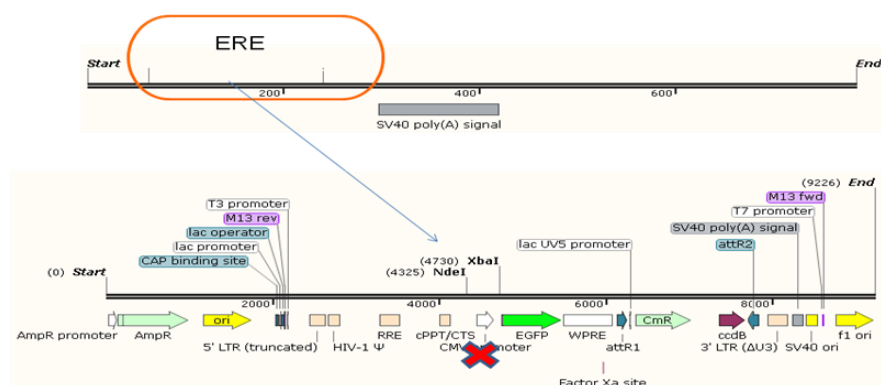


Figura 5: Esquema de la construcción del plásmido pLKO ERE-GFP. La secuencia fue insertada tras GFP mediante restricción enzimática (NdeI-XbaI).

Partículas lentivirales

El protocolo de empaquetamiento está basado en el método de Naldini (Dull et. 1998; Follenzi y Naldini, 2002a y 2002b). Las células HEK293T/17 fueron sembradas 20 horas antes de la transfección a una densidad de 6×10^6 células/p100. Antes de realizar la transfección, inhibimos la función lisosomal con cloroquina a una concentración final de $25 \mu\text{M}$. Posteriormente las células fueron sometidas a una triple transfección con los complejos DNA-fosfato cálcico. Se usaron las siguientes cantidades de plásmidos:

- $5 \mu\text{g}$ del plásmido de interés a empaquetar (pLKO ERE-GFP)
- $5 \mu\text{g}$ de pCMV-dR8.74
- 2mg de pMD2VSV.G

Los 3 plásmidos fueron añadieron a una solución de cloruro cálcico 125 mM y después a una solución salina tamponada con HEPES (HBS 2x del ingles buffered saline) pH 7,1; NaCl 280mM, HEPES 100mM NaHPO₄ 1,5mM) para formar los precipitados de fosfato cálcico-DNA. Esta solución se agrega lentamente por goteo a las células. Transcurridas 7 horas el medio fue desechado y cambiado por medio nuevo (DMEM+ suero fetal bovino 10% + antibiótico/antimicótico). 24 horas postranfección el sobrenadante fue recogido (contiene partículas virales), y guardado a -80 y se agrego medio nuevo a las células. Este proceso se repite durante 2 días consecutivos. En el último día de recogida de partículas virales, todos los medios se descongelan y son filtrados (0.45 µm) para limpiar el medio de restos celulares. Las partículas fueron alicuotadas y guardadas a -80°C hasta su uso.

Titulación de partículas virales

Se realizaron diluciones seriadas del virus EREGFP a partir de las alícuotas guardadas hasta alcanzar 10⁻⁷ y con estas diluciones se infectaron las células 293T previamente incubadas con DMEM + 8µg/ml de Polibreno en una placa de 24 pocillos a 37°C. Después de 72 horas de incubación las células fueron fijadas con PFA al 4% durante 30 minutos, e incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo GFP a una concentración de 1:500 diluido en PB 1.01N+ 0.1% de Triton X-100 (Sigma) + 0.1% de albumina de suero bovino.

Plásmido	Uso	Referencia
pMD₂VSV-G	Codifica la envoltura del virus de la estomatitis vesicular	Cedido por el Dr. Díaz-Nido (UAM-CBM)
pCMV-dR8.74	Aporta todos los elementos necesarios para el empaquetamiento de los vectores virales	Cedido por el Dr Díaz-Nido (UAM-CBM)
pLKO EREGFP	Contiene el gen que codifica GFP bajo el promotor Elementos de Respuesta a Estrógeno (ERE)	Generado en el laboratorio del Dr Torres Aleman
p3X ERE-TATA luc	Contiene la secuencia del promotor ERE	Depositado por Donald McDonnell (Addgene)
pLKOeGFP	Contiene el gen que codifica eGFP	AddGene

Tabla 3 Plásmidos empleados

ELISA de IGF-I murino y estradiol

Para determinar los niveles de IGF-I en tejido y suero se uso un kit comercial de R&D systems siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante. El tejido (hipocampo, corteza, cerebelo) fue homogenizado en 1N de ácido acético, hervido a 100°C por 20 min y centrifugado a 14000 rpm/4°C/10 min; se recupero el sobrenadante y se congelo a -80°C para su posterior liofilización, se mantuvo a -80°C hasta su uso. Las muestras se reconstituyeron con PBS pH 7.4 el mismo día que se realizo el ensayo, y la determinación de proteína por Bradford, para expresar la cantidad de IGF-I por proteína total. El suero fue diluido 1/500 en el tampón de calibración proporcionado por el fabricante.

Los niveles de estradiol en suero fueron determinados con el Kit comercial de ENZO life Science siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de estradiol se realizo de la siguiente forma:

Se agrego al suero 5 partes de dietil éter por 1 de suero, se agito en vortex durante 2 minutos, y se dejo reposar en nevera para que las fases se separen. La fase orgánica fue recuperada en eppendorf para su posterior secado en speed vac por 2 horas a 45°C, 5.1 ATM. Las muestras fueron guardadas a -80 hasta su uso. El día del ensayo se rehidrataron las muestras a temperatura ambiente con 500 µl de tampón del kit.

Inmunocitoquímica

Las células endoteliales crecieron adheridas a cristales colocados previamente sobre la placa de cultivo. Fueron lavadas con PBS 1x pH 7,4 y ayunadas durante tres horas con DMEM F-12 sin rojo fenol. Posteriormente fueron tratadas con 17β-estradiol (1nM) disuelto en DMSO, durante tres horas. Los controles fueron tratados solo con DMSO diluido 1:1000. Pasadas las 3 horas de tratamiento, las células fueron bloqueadas con una solución de bloqueo/lavado que contiene PBS pH 7,4/albumina de suero bovino al 0.1%. A partir de este punto se continuó todo el experimento sobre hielo. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-IGF-IR conjugado con fluoresceína (Neuromics) disuelto 1:20 en la solución de bloqueo durante 30 minutos en agitación. Después se hicieron dos lavados rápidos con la solución de lavado/bloqueo y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos y se realizó otro lavado para quitar el PFA 4%. Las células fueron incubadas con Hoechst (para teñir los núcleos

celulares) diluido 1:500 en la solución de lavado/bloqueo durante 5 minutos en agitación. A continuación fueron cubiertas con medio de montaje de Gerbatol y montadas en portas de cristal para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia (Leica).

Histología

Los cerebros fueron previamente extraídos y fijados con PFA 4% tal como se ha explicado previamente. Posteriormente los cerebros fueron cortados en rodajas de 50 μm de grosor en un vibratomo (Leica, Alemania). Los cortes de interés fueron seleccionados, separados y visualizados en un microscopio confocal y/o microscopio de fluorescencia (Leica), o guardados en oscuridad con PB 0.1N + azida al 0.02% a 4°C hasta su uso.

Extracción de proteína y preparación de lisados

Las muestras de tejido fueron homogenizadas (Ultraturrax, IKA, Alemania) en tampón de extracción de proteínas a pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris HCl 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, NP40 1%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma; PMSF 1 mM, sodio o-vanadato 1 mM). Para los lisados celulares se agrego el mismo tampón de extracción de proteínas directamente en la placa a 4°C, y 10 minutos después se rascaron los pocillos, los lisados fueron centrifugados a 14000 rpm/4°C/10 min para eliminar cualquier resto celular insoluble. Cuando se extrajeron las proteínas por Trizol, el precipitado fue resuspendido en SDS 1% y solo se usaron para western blot. La cantidad de proteína total fue determinada mediante el método de Bradford (Bio-Rad), o BCA (Acido bicinchoninico y sulfato de cobre, Sigma) para los lisados con SDS. En ambos casos como estándar se uso albumina de suero bovino.

Western Blot

Las muestras se mezclaron con tampón de carga Laemmli 5X ,5% de β -mercaptoetanol. Para desnaturalizar las proteínas se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente fueron separadas en geles SDS-PAGE (Bio-Rad) al 10% (25 μl de lisado por pocillo). Como marcadores de pesos moleculares fueron usados: MagicMark XP Western Standard (Invitrogen) y Prosieve QuadColor Protein Markers (Lonza). El voltaje inicial fue de 80 V y tras media hora, se aumentó a 120V. Las proteínas fueron transferidas a

una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante una hora a 350 mA; o Immobilon (Milipore), (previamente activada con metanol) durante 50 min a 295 mA. El bloqueo de la membrana se realizó en tampón Tween 20 (al 0.1%)- Tris Salino (TTBS) con 5% de leche desnatada. Después se incubaron con anticuerpos primarios (ver tabla) durante toda la noche a 4°C. El control de carga (β -actina) fue incubado durante 2h a temperatura ambiente. En el caso de los experimentos en los que se utilizó el complejo peroxidasa estreptavidina-biotina (Invitrogen), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Todos los lavados fueron con TTBS 3 veces/10 min. Las membranas incubadas con estreptavidina se incubaron con solución quimioluminiscente (Pierce ECL, Thermo Fisher Scientific) después de los lavados. Las demás membranas se lavaron con TTBS 3 veces/10min, y fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas de nuevo con TTBS 3 veces /10 min, y para detectar la señal quimioluminiscente se usaron los reactivos de revelado de Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific) y las películas de alta resolución de quimioluminiscencia (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare). La intensidad de las bandas obtenidas fue medida por densitometría (BioRad, GS800 Densitómetro Calibrado) usando el programa de cuantificación Quantity One (Bio-Rad): se obtuvo la densidad óptica X área (mm²) ajustada al volumen (DXA) para las bandas de interés. Los resultados de cada una de las membranas fueron normalizados con los valores del control de carga.

<u>Anticuerpo Primario</u>	<u>Dilución (en TTBS)</u>	<u>Especie</u>	<u>Casa Comercial</u>	<u>Tipo</u>
ER α	1:2000	Ratón	Abcam	Monoclonal
MDM2	1:500	Ratón	SantaCruz Biotechnology	Monoclonal
IGF-1R β	1:500	Conejo	SantaCruz Biotechnology	Policlonal
β -actina	1:40000	Ratón	Abcam/Sigma	Monoclonal
Estreotavidina-HRP	1:1000		Invitrogen	
p53	1:1000	Ratón	Cell Signalling	Monoclonal
GFAP	1:1000	Conejo	Dako	Policlonal
IGF-IR conjugado con fluoresceína	1:20	Ratón	Neuromics	Monoclonal
GFP	1:500	Conejo	Invitrogen	Policlonal
Orexina A	1:1000	Cabra	Santacruz Biotechnology	Policlonal
<u>Anticuerpo Secundario</u>		<u>Dilución</u>	<u>Casa Comercial</u>	<u>Tipo</u>
anti-ratón IgG unido a peroxidasa		1:10000	Biorad	Policlonal
anti-conejo IgG unido a peroxidasa		1:10000	Biorad	Policlonal

Tabla 4 Anticuerpos empleados

Extracción de ARN

La extracción fue realizada con el reactivo comercial Trizol (Ambion), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, para aislar ARN y proteína de tejidos y de cultivos primarios. El ARN fue reconstituido con agua libre de nucleasas (Ambion); la concentración y calidad del ARN fueron medidas por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Se obtuvieron concentraciones en un rango de 1-0.5 µg/µl y solo se usaron las muestras que estaban dentro de los ratios de calidad 260/280 y 260/230. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su uso.

Retrotranscripción por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La retrotranscripción de 0.5 µg de ARN a ADNc se realizó con el Kit de transcripción reversa de alta capacidad (Applied Biosystems) en termociclador (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc obtenido fue diluido 4 veces para eliminar restos de los compuestos presentes en la muestra y por último se guardó a -20°C hasta su uso.

Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR)

Para la amplificación del ADNc usamos sondas Taqman (Applied Biosystems) que no detectan ADN genómico, descritas en la tabla 5; como control endógeno usamos la sonda 18s RNA ribosomal, que es un gen de expresión estable. Cada muestra fue evaluada por triplicado en 20 µl de reacción (5 µl de ADNc +15 µl de una mezcla de cebadores, sondas, master mix) usando Taqman Universal PCR Master Mix, siguiendo el protocolo de Applied Biosystems. El equipo utilizado para la qPCR fue ABIPrims7000 con el siguiente programa: 50°C 2 minutos; 1 repetición, 95°C 10 minutos, 1 repetición. 95°C 15 segundos 1 repetición, 60°C 1 minuto, 40 repeticiones. Para el análisis de la cuantificación relativa usamos el método modificado $2(-\Delta\Delta C(T))$ (Pfaffl, 2001). Los resultados son expresados como el ratio del gen en estudio frente al control endógeno (18s) de muestras control.

Gen	Especie	Secuencia	Referencia
IGF-I	Mus musculus	GCTTTTACTTCAA CAAGCCCACAGG	Mm00439560_m1
IGF-IR	Mus musculus	GGCCAGAAGTGG AGCAGAATAATCT	Mm00802831_m1
miR-375	Mus musculus	ACAAACCGGACC TGAGCGTTTTGTT	Mm04231554_s1
18s	Mammalia		4319413E

Tabla 5 Sondas Taqman empleadas para los experimentos de qPCR

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Cada grupo experimental cuenta con un número de animales o experimentos de 5-10. Después de pasar la prueba de normalidad usamos la prueba T de Student para comparar 2 grupos, y ANOVA de una vía para comparar más de 2 grupos, seguido de la prueba de comparación múltiple post-hoc Bonferroni. Los resultados se muestran como medias \pm error estándar de la media (\pm SEM por sus siglas en inglés). Los datos analizados fueron considerados estadísticamente significativos al obtener *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.005.

Resultados

Dimorfismo sexual en la modulación del estado de ánimo por el ejercicio físico

Los efectos beneficiosos del ejercicio en parte están mediados por factores neurotróficos; entre estos se encuentra el IGF-I circulante (Carro et. al. 2000; Carro et. al. 2001). Recientemente se ha reportado que estos efectos son sexualmente dimórficos (Baker et. al. 2010), por lo que decidimos explorar en más detalle el efecto del IGF-I circulante en el estado de ánimo, ya que éste es bien conocido que es modulado por el ejercicio. Primero buscamos si había diferencias sexuales en la conducta de los ratones en respuesta al ejercicio físico forzado. Usamos las siguientes pruebas de comportamiento: laberinto de brazos cruzados, para medir los niveles de ansiedad; actímetro, para medir la actividad total de los ratones durante la aplicación de diferentes estímulos y, además, como control de la mayor actividad global que suele ser inducida por el ejercicio físico. Asimismo, empleamos una batería de estímulos para medir el estado de alerta, además de la prueba de nado forzado como inductor de estrés; finalmente, medimos la resistencia al estrés con la prueba de suspensión de la cola.

Dimorfismo Sexual en los niveles de ansiedad pre y post ejercicio.

Después de dos semanas de ejercicio físico forzado analizamos los niveles de ansiedad en ratones machos y hembras de la misma edad; encontramos que basalmente las hembras muestran niveles bajos de ansiedad en comparación con los machos (Figura 6, A). y que el ejercicio físico tiene un efecto ansiolítico solo en machos (Figura 6, B).

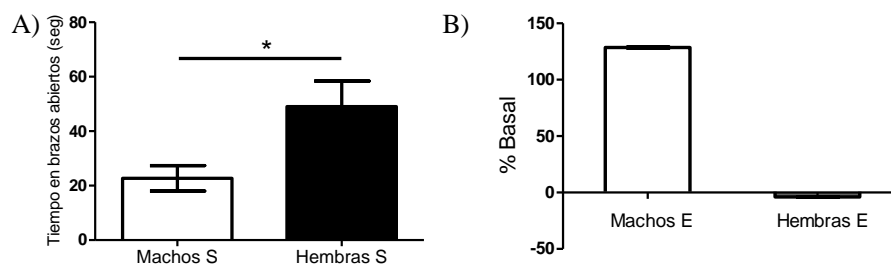


Figura 6 Niveles de ansiedad en ratones machos y hembras normales: A) Niveles de ansiedad en ratones sedentarios B) Niveles de ansiedad en ratones ejercitados respecto a sedentarios. Los machos ejercitados mostraron un incremento significativo en el tiempo que se pasan explorando los brazos abiertos respecto al empleado por machos sedentarios (los valores se expresan como porcentaje respecto a animales sedentarios). Mayor tiempo pasado explorando los brazos abiertos indica menores niveles de ansiedad. T de Student: * $p < 0.05$

Dimorfismo Sexual de la resistencia al estrés proporcionada por el ejercicio físico

Micro ARN 375 como indicador de resiliencia

Otro parámetro a evaluar es la resistencia al estrés generada por el ejercicio físico y el posible dimorfismo sexual presente en la respuesta al estrés (Kosten et. al. 2007). Para ello, en primer lugar, analizamos los niveles del micro ARN 375 (mir 375) como indicador de resiliencia, por estar relacionado con procesos de estrés, habiéndose reportado en bibliografía que niveles elevados de este microARN están asociados a este tipo de respuestas (Gapp et. al. 2014). Asimismo, la determinación de este miR se llevó a cabo en hipocampo, por ser ésta una estructura vulnerable al estrés. Como resultado observamos que los machos tienen elevados los niveles del micro ARN 375 en comparación con hembras (Figura 7).

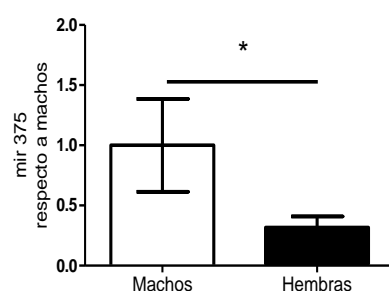


Figura 7 Niveles de mir 375 en hipocampo de ratones C57. Los niveles del micro RNA fueron analizados por qPCR y relativizados a machos . T de Student: *p<0.05

Resistencia al estrés mediada por ejercicio físico

Como factor importante que revela el estado de ánimo, examinamos también si el ejercicio genera resistencia al estrés. Para ello expusimos a los ratones a nado forzado antes de realizar ejercicio y posteriormente a la prueba de suspensión por la cola (Figura 3) como se indica en el siguiente esquema:

Nado Forzado	Habitación a Cinta de correr	Cinta de Correr		Suspensión por la cola
1 día 6 min	1 día 30 minutos	5 días por semana 40 minutos	2 días	1 día 6 min

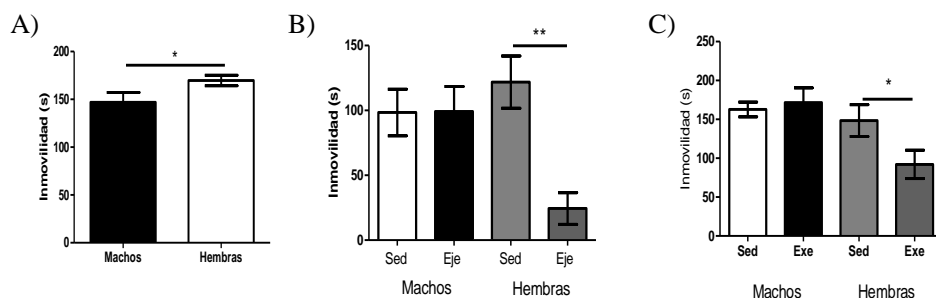


Figura 8 Susceptibilidad a estado depresivo y resistencia al estrés: A) Tiempo de inmovilidad en nado forzado comparando niveles basales. B) Tiempo de inmovilidad en suspensión por la cola post ejercicio. C) Tiempo de inmovilidad en nado forzado pre y post ejercicio. Las hembras sedentarias mostraron mayor tiempo de inmovilidad respecto al empleado por machos sedentarios (los valores se expresan en segundos). Mayor tiempo de inmovilidad es un indicador de estrés y depresión. Se analizaron los últimos 4 minutos de cada prueba con una duración en total de 6 minutos por cada ratón. T de Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Encontramos que las hembras son ligeramente más susceptibles al estrés que los machos según los resultados del test de nado forzado, pero después de realizar ejercicio físico solo las hembras, muestran mayor resistencia al estrés, tal como se ve en las pruebas de suspensión por la cola y natación forzada.

Estado de atención esta incrementado en hembras por el ejercicio físico.

Como se ha reportado que el ejercicio físico también tiene efectos en el estado de atención (Lambourne y Tomporowski 2010), examinamos un posible dimorfismo sexual en este estado mediante tres estímulos consecutivos (olfativo, táctil y vestibular) un día después de finalizar el ejercicio físico (Figura 9). Observamos que el estímulo olfativo y táctil no inducen un incremento del estado de alerta post ejercicio; pero si el estímulo vestibular, que promueve un aumento de los niveles de alerta en hembras ejercitadas en comparación con las sedentarias o con machos sedentarios y ejercitados, hay que resaltar que este estímulo es susceptible a estrógenos (Mong et. al. 2003).

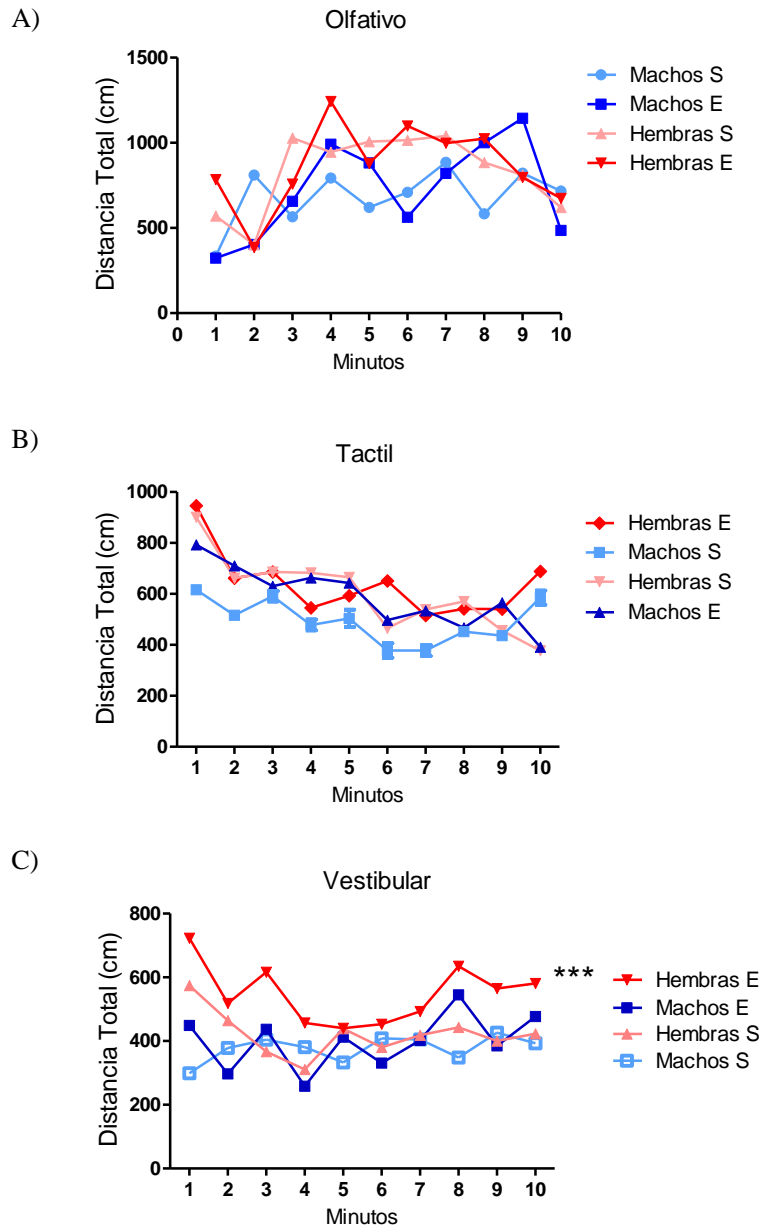


Figura 9 Estado de alerta. Se muestra la distancia total después de 10 minutos en actímetros A) Estimulo Olfativo: consiste en 10 segundos de exposiciòn a 10 mililitros de benzaldehído al 100% B) Estimulo Tactil: dos segundos de exposicion a aire comprimido en el lomo del raton C) Estimulo Vestibular: 8 segundos en un agitador orbital a 90 rpm. Solo con el estimulo vestibular se observan

diferencias significativas, las hembras ejercitadas tienen mayores niveles de alerta comparadas con las hembras sedentarias. Anova 1 vía: *** $p < 0.0005$ post hoc Bonferroni: ** $p < 0.005$

Diferencias sexuales en los niveles de IGF-I en respuesta al ejercicio físico

Debido a las claras diferencias sexuales del efecto del ejercicio sobre el estado de ánimo, y dado que el IGF-I es un importante modulador del mismo (Carro et. al. 2000), examinamos los niveles de IGF-I en respuesta al ejercicio y comparamos las diferencias entre machos y hembras en diversas estructuras del cerebro como corteza, cerebelo e hipocampo.

El cerebelo es la estructura que integra y controla la información del aparato locomotor, además de mostrar dimorfismo sexual (Doulazmi et. al. 1999; Dean et. al., 2012). Miramos en esta estructura los niveles de IGF-I y de su receptor mediante ELISA y Western blot respectivamente. Encontramos que los niveles de IGF-I y de su receptor no cambian después de realizar ejercicio, tanto en machos como en hembras. (Figura 10)

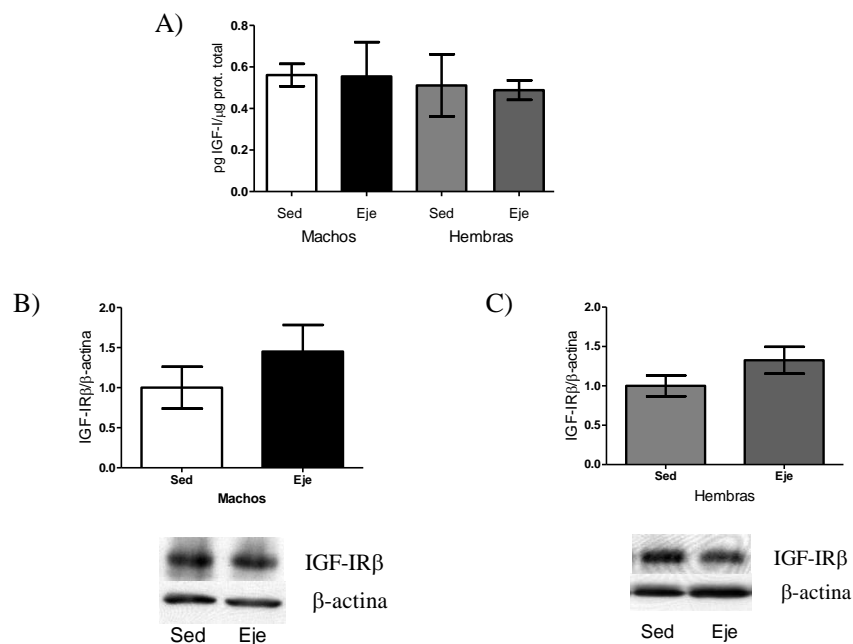


Figura 10 Niveles de IGF-I y su receptor en el cerebelo de ratones C57 machos y hembras. Los niveles del péptido se analizaron por ELISA y los niveles del receptor se analizaron mediante western blot. A) Niveles de IGF-I B) Niveles de IGF-IR en machos, C) Niveles de IGF-IR en hembras, se

muestran imágenes representativas de las membranas. No hay diferencias significativas entre machos y hembras.

A continuación nos centramos en el hipocampo, ya que es una región del cerebro particularmente relevante en los desordenes del estado de ánimo (Andrus et. al. 2012); además de ser una de las aéreas del cerebro más relacionadas con ansiedad (Adhikari 2014), es una estructura sensible al ejercicio físico y actividad física (Vijay et. al. 2015; Inoue et. al. 2006). También se ha descrito que en respuesta al ejercicio físico el hipocampo captura IGF-I circulante (Carro et. al. 2000). La principal función del hipocampo se piensa que está en relación con funciones de memoria y aprendizaje, de ahí que aparezca relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas (Moodley K.K. and Chan D 2014). Estas características hacen del hipocampo una estructura de interés para analizar la posible conexión entre IGF-I y la modulación del estado del ánimo a través del ejercicio físico.

Como se observa en la Figura 11, el ejercicio moduló los niveles de IGF-I y de su mensajero solo en el hipocampo de hembras.

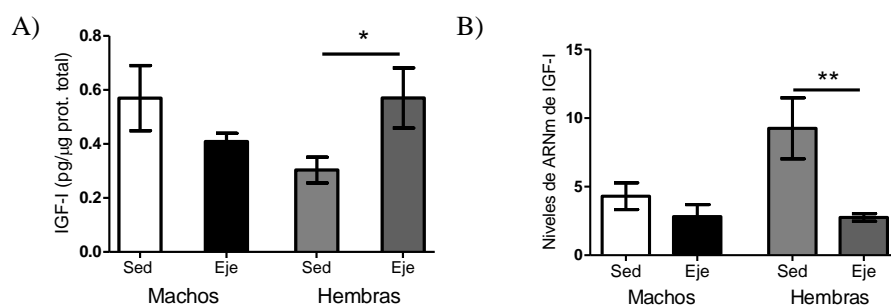


Figura 11 Niveles de IGF-I en hipocampo de ratones machos y hembra: A) niveles de Proteína B) Niveles de ARNm de IGF-I. El ejercicio incrementa los niveles de IGF-I en hipocampo de hembras y disminuye los niveles del mensajero en respuesta al incremento de la proteína. Los niveles de proteína fueron analizados por ELISA y los niveles del ARNm fueron analizados por qPCR. T de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Niveles de Receptor de IGF-I en hipocampo.

Dados los cambios vistos en los niveles de IGF-I, analizamos si el ejercicio físico produce cambios en la expresión de su receptor. Observamos que tanto en machos como

en hembras ejercitadas se produce un incremento en los niveles de IGF-IR medido por Western Blot (Figura 12)

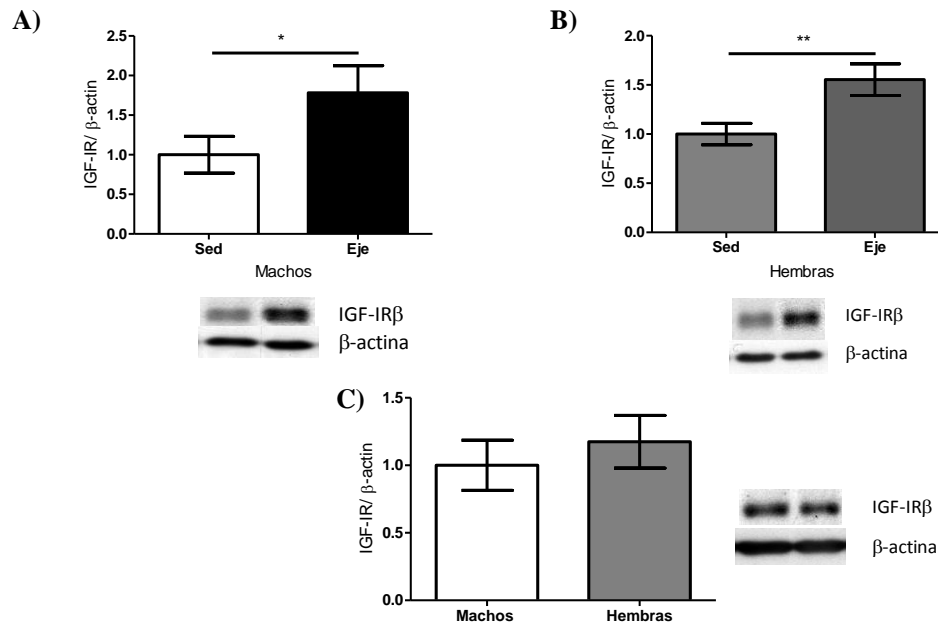


Figura 12 Niveles de IGF-IR en hipocampo: A) Machos sedentarios y ejercitados, B) Hembras sedentarias y ejercitadas, C) Comparación entre machos y hembras sedentarios. Se muestran imágenes representativas de las membranas. El receptor de IGF-I incrementa en los ratones ejercitados tanto en machos como en hembras pero no hay diferencias significativas entre machos y hembras. Los niveles del receptor de IGF-I se analizaron mediante western blot T de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Ejercicio Agudo

Para comprobar si el régimen de ejercicio es determinante en las respuestas observadas en hembras respecto al incremento de IGF-I, se sometieron a una sola sesión de ejercicio a un grupo de ratones machos y hembras. Comparamos los niveles de IGF-I después de realizar ejercicio agudo durante 40 minutos, (este grupo tan solo había tenido una sesión de habituación al treadmill durante 20 minutos). Observamos que solo en los machos hay una tendencia (que no llega a ser significativa) a incrementar los niveles de IGF-I en el hipocampo, mientras que en las hembras no observamos cambios (Figura 13).

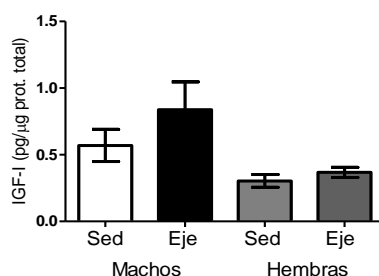


Figura 13 Niveles de IGF-I en hipocampo después de ejercicio agudo. El ejercicio agudo no produce cambios significativos en los niveles de IGF-I en hipocampo en hembras, pero si una tendencia a incrementar en machos. Los niveles del péptido se analizaron por ELISA. Se compararon los niveles de IGF-I de machos y hembras tras una sola sesión de ejercicio forzado (12 m /m durante 40 min).

Las hormonas ováricas modulan los niveles de IGF-I

Por otra parte, como nuestras observaciones de los cambios en los niveles de IGF-I después del ejercicio físico están relacionados con los cambios en la conducta de los ratones, siendo las hembras más susceptibles a estos cambios, analizamos las hormonas sexuales como posibles moduladores del IGF-I, ya que existe una abundante literatura relacionando a este factor trófico con los esteroides gonadales.

Primero comparamos los niveles de IGF-I en hipocampo en las fases del ciclo estral donde los niveles de estradiol incrementan (Proestro) o disminuyen (Diestro) en ratones normales y en mutantes LID que presentan niveles bajos de IGF-I circulante, para comprobar que la modulación de los niveles de IGF-I hipocámpal es principalmente por el IGF-I circulante y no el endógeno del cerebro.

Encontramos que IGF-I es directamente proporcional con los niveles de estrógenos, pero su mensajero no se ve modificado en ratones normales; mientras que en ratones LID no vemos ningún cambio significativo en los niveles de IGF-I (Figura 14).

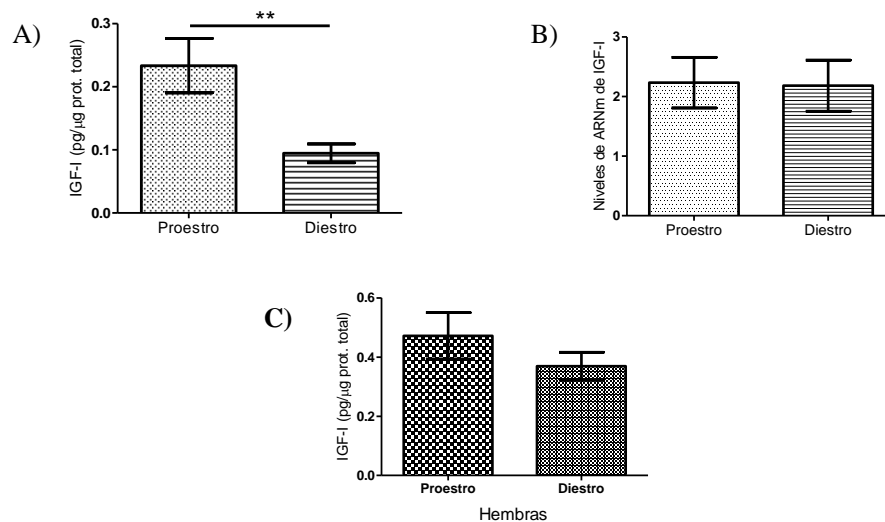


Figura 14 Modulación de IGF-I en el hipocampo durante el ciclo estral: A) niveles de IGF-I. B) niveles de ARNm de IGF-I. C) Niveles de IGF-I en ratones LID. Solo hay cambios significativos en los niveles de IGF-I en hembras normales. Se analizaron los niveles del péptido mediante ELISA y los niveles de ARNm por qPCR. T de Student **p<0.005.

Posteriormente ovariectomizamos a un grupo de hembras y después de un mes evaluamos los niveles de ansiedad (Figura 15). Las hembras ovariectomizadas mostraron un comportamiento más ansioso que las hembras intactas y como resultado de la ovariectomía se perdieron los efectos del ejercicio sobre IGF-I hipocampal (Figura 16).

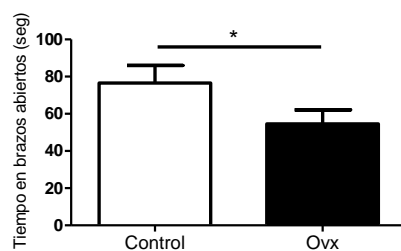


Figura 15 Niveles de ansiedad en hembras ovariectomizadas (Ovx). Las hembras ovariectomizadas permanecen menos tiempo en los brazos abiertos en comparación con las hembras intactas. T de Student * p<0.05

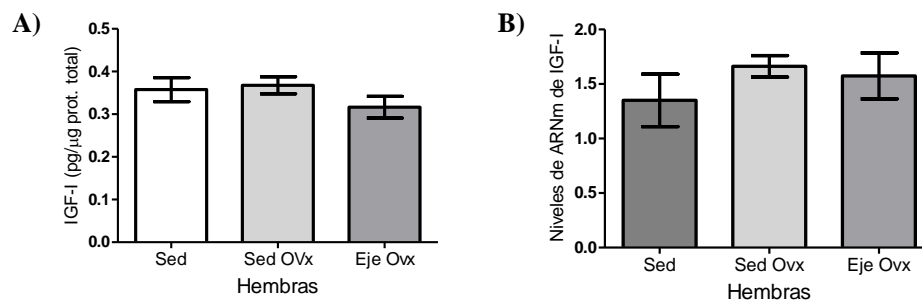


Figura 16 La ovariectomía inhibe el efecto estimulador del ejercicio sobre IGF-I en el hipocampo: A) Niveles de IGF-I. B) Niveles de RNAm de IGF-I. No se observaron cambios significativos en estos grupos.

Niveles de IGF-I en suero y ARNm de IGF-I en hígado

Como los datos indican que el IGF-I circulante está relacionado con los cambios observados en la conducta; medimos IGF-I en suero y el ARN mensajero de IGF-I en el hígado por ser el mayor productor de IGF-I circulante (Figura 17). No observamos cambios significativos de IGF-I en el suero de machos, pero si una tendencia a incrementar en hembras tras el ejercicio. El ejercicio no modifica significativamente los niveles del ARN mensajero de IGF-I, pero hay diferencias significativas entre machos y hembras.

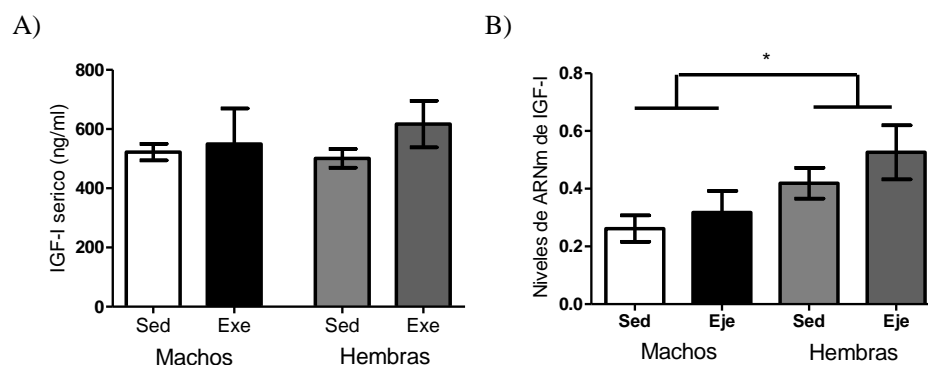


Figura 17 IGF-I periférico en machos y hembras C57 A) Niveles de IGF-I en suero. B) Niveles de ARN mensajero de IGF-I en hígado. Los niveles de IGF-I en suero tienden a incrementar en hembras ejercitadas, esta tendencia puede deberse a que las hembras tienen mayores niveles de ARNm de IGF-I en hígado. Anova de 2 vías * $p < 0.05$.

Interacción de IGF-I y estradiol

Como se ha reportado que el IGF-I circulante puede entrar al cerebro a través de la barrera entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo, formada por los plexos coroideos (Carro et. al. 2000) o atravesando la barrera hematoencefálica (Nishijima et. al. 2010). Decidimos comprobar la interacción de IGF-I y estradiol en estos dos tipos celulares especializados en mediar el paso de sustancias al cerebro: las células endoteliales de los vasos y las células epiteliales del plexo coroideo.

Encontramos que solo las células endoteliales son capaces de capturar más IGF-I en respuesta al tratamiento con estradiol, aunque esta captura no es dependiente del género (Figura 18).

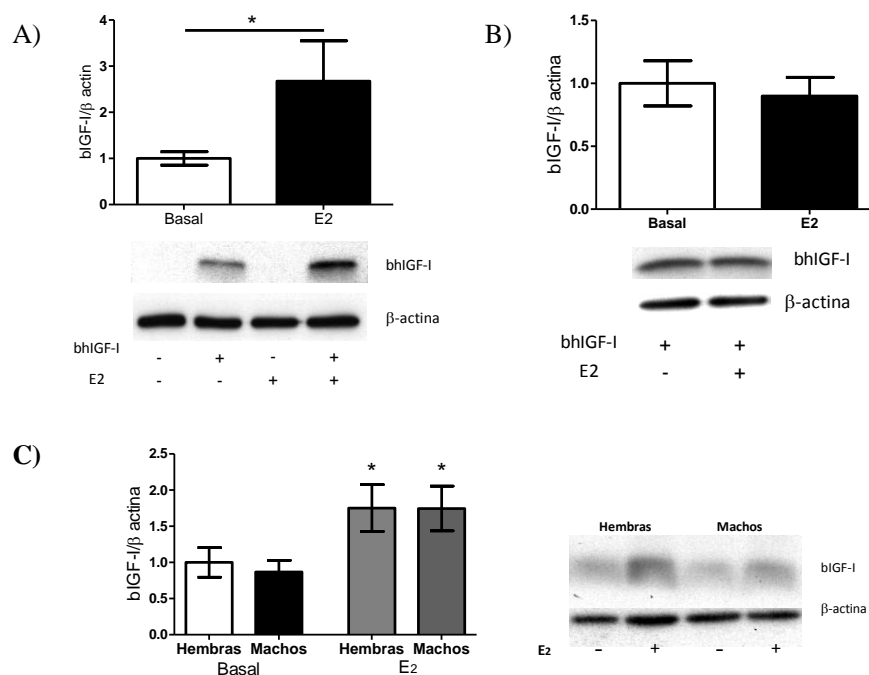


Figura 18 Captura de IGF-I biotinilado A) Células de endotelio de cerebro. B) Células de plexo coroideo. C) Células de endotelio de cerebro obtenidas de donantes macho o hembra. El estradiol incrementa la captura de IGF-I en endotelio cerebral tanto de machos como de hembras, pero no modula la captura de IGF en plexo coroideo. Las células de cultivos primarios fueron tratadas con IGF-I biotinilado () durante 3 h; posteriormente se lisaron para su análisis por western blot. T de Student * $p < 0.05$.

Además mediante inmunocitoquímica observamos la interacción de estradiol y el receptor de IGF-I en las células endoteliales, Después de tres horas de tratamiento con estradiol observamos un incremento de la expresión del receptor de IGF-I en la membrana plasmática de las células endoteliales (Figura 19).

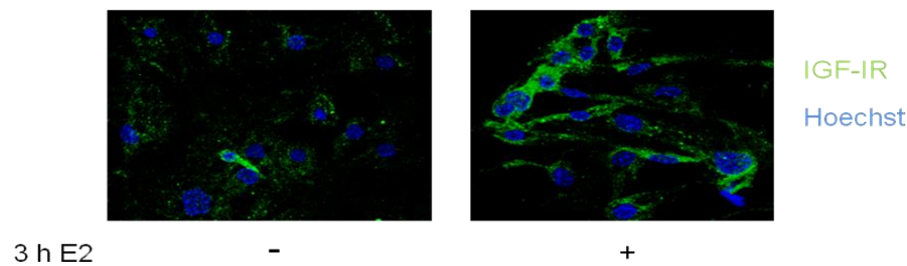


Figura 19 Expresión del IGF-IR en membrana de células endoteliales. Tratamiento de E2 1nM durante 3 horas incrementa la expresión del receptor de IGF-I en la membrana. Inmunocitoquímica con anticuerpo IGF-IR 1:500 marcado con fluorosceína durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se fijaron las células con PFA al 4% durante 10 min y en el ultimo lavado se incubo con Hoechst 1:500 durante 5 minutos. Microscopio de fluorescencia 40x.

Posteriormente analizamos mediante inhibidores y agonistas específicos, el subtipo de receptor de estradiol involucrado en la captura de IGF-I. Observamos que el aumento en la captura de IGF-I está mediado por la activación (estimulación) del receptor de estrógeno alfa (Figura 20), sin que el subtipo beta parezca estar involucrado.

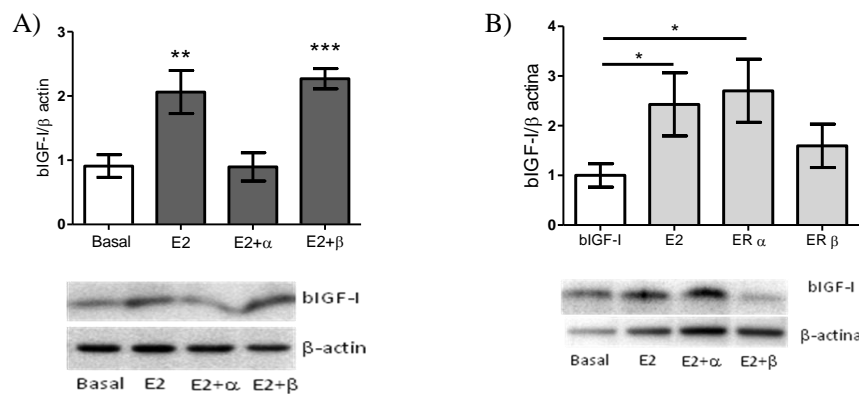


Figura 20 Modulación de la endocitosis de bIGF-I por antagonistas y agonistas de los receptores de estrógenos: A) Solo el antagonista del receptor alfa inhibe el efecto del estradiol, MPP (ER α): 10^{-8} M; PHTPP (ER β): 10^{-8} M. B) El agonista alfa imita la acción del estradiol, pero no el agonista beta, PPT (ER α): 10^{-8} M; DPN (ER β): 10^{-9} M. Los niveles de IGF-I biotinilado se analizaron mediante western blot. T de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

Estos datos in vitro indican una estimulación de la captura de IGF-I por células endoteliales de los vasos cerebrales inducida por el E2, que podría explicar el incremento de IGF-I en el cerebro.

El ejercicio físico incrementa la actividad de los receptores de estrógenos en el cerebro

Para comprobar los datos previamente observados in vitro, analizamos el papel de los estrógenos en ratones hembra durante el ejercicio, mediante un reportero de la actividad de estos receptores. Este reportero expresa GFP y fue vehiculado por un lentivirus que usamos para infectar el endotelio de los ratones via intracarotida. Primero transfectamos células con la construcción EREGFP para verificar que la expresión de GFP era sensible a estradiol (Figura 16); una vez comprobado que el sistema de expresión lentiviral funcionaba, infectamos ratones via intracarotida con las partículas lentivirales generadas con esta construcción reportera (Figura 21)

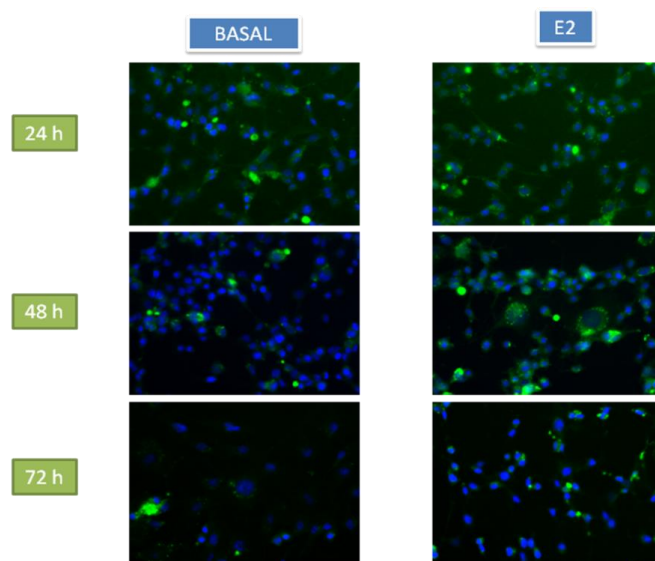


Figura 21 Expresión del plásmido reportero EREGFP en células 293T. Se realizaron tratamientos de E2 (1nM) a 24h, 48h y 72h, para comprobar la actividad del reportero de receptores de estrógenos. GFP en verde y Hoechts (1:500 durante 5 minutos) en azul. Microscopio de fluorescencia 40x.

Analizamos los niveles de GFP por inmunocitoquímica en cerebro total, y en hipocampo por western blot. Encontramos que el ejercicio incrementa la actividad de los receptores de estrógeno en el cerebro de ratones hembras ejercitadas (Figura 22 A, 22 B). Por otra

parte analizamos los niveles de estradiol en sangre y encontramos que los niveles de esta hormona disminuyen significativamente en las hembras que realizaron ejercicio (Figura 22 C).

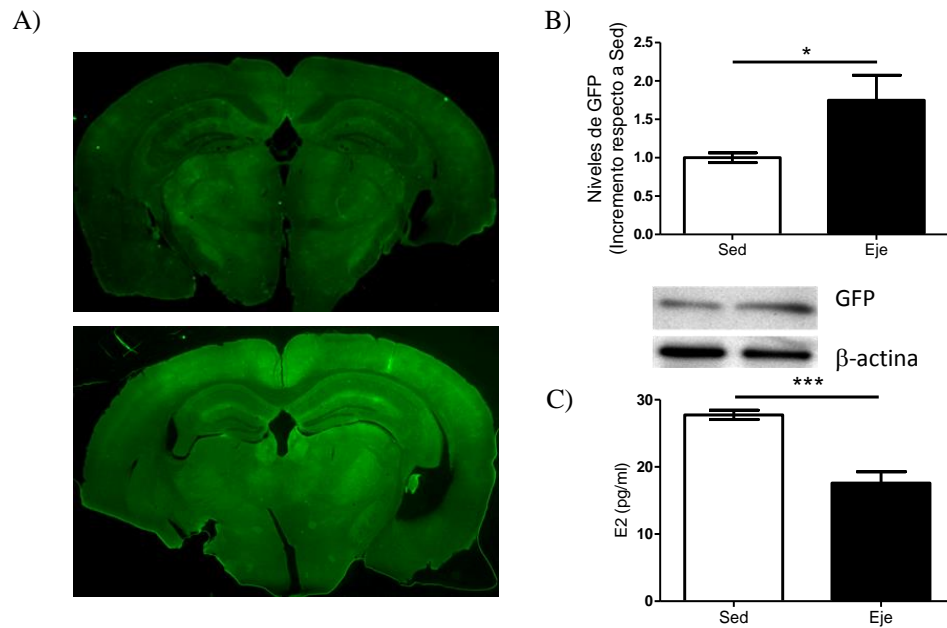


Figura 22 Expresión de GFP bajo el promotor ERE in vivo y niveles de estradiol en suero: A) Cortes de cerebro de ratones hembra sedentaria (arriba) y ejercitada (abajo). B) Niveles de proteína de GFP en hipocampo. C) Niveles de estradiol en suero. Después de 2 semanas post infección vía carótida los ratones se expusieron a la banda de correr durante dos semanas. Posteriormente se compararon los cerebros totales de ratones sedentarios con ratones ejercitados y mediante western blot se analizaron los niveles de GFP en hipocampo. T de Student * $p < 0.05$ *** $p < 0.0005$ Lupa de fluorescencia 15x (Leica).

El receptor alfa no modifica los niveles de ansiedad en hembras jóvenes

Se ha reportado que IGF-I tiene un efecto ansiolítico, pero en nuestros datos no observamos cambios significativos en los niveles de ansiedad en las hembras ejercitadas que a su vez muestran mayores niveles de IGF-I en el hipocampo. Además, hemos observado que el incremento de IGF-I en el cerebro es debido a las hormonas ováricas,

específicamente a través del receptor alfa de estrógenos. Basándonos en estas observaciones, tratamos a un grupo de hembras con un antagonista específico del receptor alfa (MPP) y comparamos los niveles de ansiedad post ejercicio físico. (Figura 23). Observamos que el bloqueo de los receptores alfa de estrógeno no produce cambios significativos en los niveles de ansiedad.

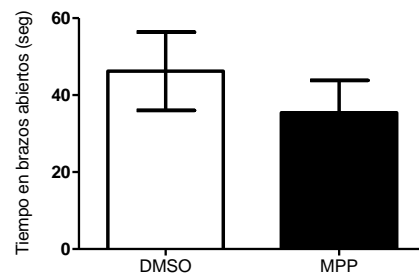


Figura 23 Niveles de ansiedad en Ratones C57 hembra tratados con un antagonista específico del receptor de estrógenos alfa. Ratones inyectados cada tres días con MPP (0.052g/Kg) o DMSO (0.1 ml de 1:1000) post ejercicio durante dos semanas de entrenamiento en cinta de correr (0.2 m/s, 40 min/día, 5 días/semana). T de Student * $p < 0.05$

El ejercicio modula el estado de animo en parte a través del IGF-I circulante

Para confirmar el papel del IGF-I serico en la modulacion del estado de ánimo en hembras, medimos los niveles de ansiedad en ratones hembra mutantes LID. Estos ratones tienen 75% menos de IGF-I circulante en comparacion con ratones control. Encontramos que estos ratones muestran mayores niveles de ansiedad, tal como se determina en el test del EPM ,y el ejercicio fisico no los modifica. Además, en lugar de encontrar niveles elevados de IGF-I en el hipocampo tras ejercicio, observamos todo lo contrario, una disminución en los niveles de IGF-I en hipocampo de ratones LID hembra despues de dos semanas de ejercicio forzado (Figura 24)

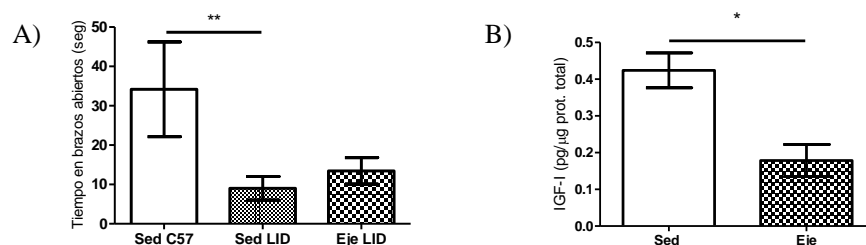


Figura 24 Niveles de ansiedad e IGF-I en ratones hembra LID A) Tiempo en brazos abiertos del EPM. B) Niveles de IGF-I en hipocampo. Los ratones hembra LID tienen mayores niveles de ansiedad que las hembras normales y post ejercicio hay una disminucion significativa de IGF-I en el hipocampo de estos ratones. Se midio el tiempo en los brazos abiertos en el laberinto de brazos cruzados durante 5 minutos y los niveles de IGF-I en hipocampo de ratones hembras LID mediante ELISA, T de Student * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

Interacción entre IGF-I circulante y estradiol en la modulación del estado de ánimo a través del ejercicio físico

La presencia de IGF-I circulante y hormonas ováricas es necesaria para que el ejercicio regule el estado del ánimo

Analizamos el papel del IGF-I circulante y el receptor alfa de estrógenos en la resistencia al estrés, que es potenciada por el ejercicio. Para ello comparamos ratones normales con ratones tratados con MPP (antagonista alfa) para comprobar el efecto de las hormonas ováricas por una parte, y ratones LID como modelo de insuficiencia de IGF-I circulante. Observamos que el ejercicio físico proporciona resistencia al estrés y este efecto es atenuado por el bloqueo del receptor alfa de estrógenos, y que niveles bajos de IGF-I circulante no proporcionan resistencia al estrés post ejercicio. Además, los ratones LID muestran un mayor comportamiento depresivo, tal como se determina en el test de suspensión por la cola. (Figura 25).

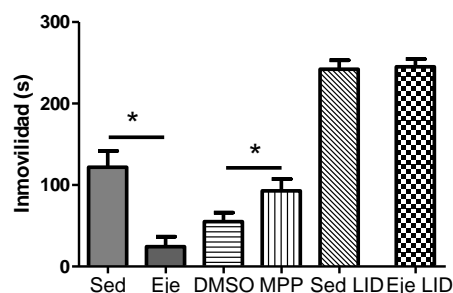


Figura 25 El ejercicio aumenta la resistencia al estrés. Se comparo el tiempo de inmovilidad de ratones hembras sedentarios (Sed) y ejercitados (Eje) con grupos de hembras normales ejercitadas tratados con DMSO o MPP y otro grupo de ratones LID sedentarios y ejercitados. Solo las hembras normales e intactas presentan mayor resistencia al estrés tras ejercicio. Se contabilizo el tiempo de inmovilidad en los últimos 4 minutos de la prueba de suspensión por la cola. Cuatro grupos realizaron ejercicio forzado: ratones hembras control sin tratamiento, ratones tratados con DMSO o MPP y ratones hembra LID, MPP (0.052g/Kg) o DMSO (0.1 ml de 1:1000) T de Student * $p < 0.05$.

El IGF-I circulante y las hormonas ováricas son imprescindibles para que el ejercicio regule el estado de alerta.

De acuerdo a nuestros datos, las hembras que realizaron ejercicio físico muestran una mayor atención (medida como alerta vestibular), lo que correlaciona con un incremento de IGF-I circulante en el hipocampo. Para indagar más respecto de la interacción de estas hormonas y la modulación de la atención por ejercicio, miramos si la usencia de hormonas ováricas y la disminución de IGF-I circulante la afectan (Figura 26)

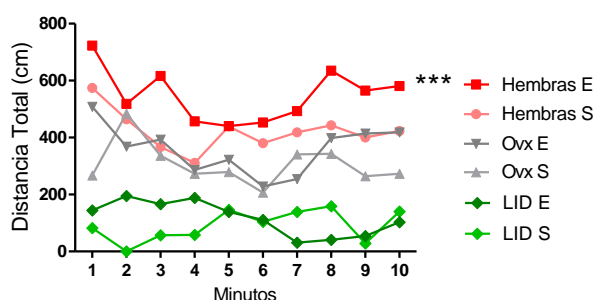


Figura 26 Modulación del estado de alerta tras ejercicio. El estado de alerta incrementa post ejercicio en hembras normales; mientras que la falta de hormonas ováricas o niveles bajos de IGF-I periférico reducen el estado de alerta independientemente del ejercicio físico. Representación de la distancia total por minuto, la duración total de la prueba fue de 10 minutos después del estímulo vestibular, utilizando un agitador horizontal a 90 r.p.m. durante 8 segundos. Anova 1 vía *** $p < 0.0005$ post hoc Bonferronis ** $p < 0.005$

Regulación del estado del ánimo a lo largo del tiempo: hembras control y APP/PS1 de mediana edad

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades con mayor prevalencia en mujeres (Viña y Lloret 2010; Alzheimer's Association 2014). Se ha sugerido que la menopausia es un factor a tener en cuenta (Rettberg et. al. 2016), pero la falta de evidencia y datos discordantes hacen que este tema permanezca sin esclarecer (Pines A 2016). De acuerdo a esta información y nuestros datos, decidimos investigar el estado de ánimo en ratones hembras C57 y APP/PS1 de mediana edad (8-9 meses) (lo que es equivalente a mujeres pre-menopausicas), como un posible indicador de la enfermedad de Alzheimer, que suele venir precedida por cambios en el estado de ánimo (Masters MC et. al. 2015) y una ventana para posibles tratamientos con IGF-I y/o agonistas del receptor de estrógeno alfa.

Primero analizamos los niveles de IGF-I (Figura 27) y el estado de ánimo en hembras normales de mediana edad (Figura 28) para saber si la edad es una variable en la modulación del estado del ánimo por el ejercicio físico. Posteriormente analizamos a las hembras APP/PS1 como modelo de la enfermedad de Alzheimer.

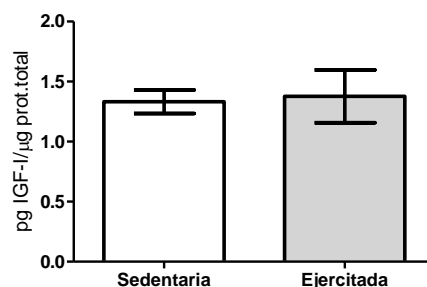


Figura 27 Niveles de IGF-I en hipocampo de hembras normales de mediana edad: Se analizaron los niveles del péptido mediante ELISA, después de dos semanas de exposición a la cinta para correr (12 m/m durante 40 min/día). No se observaron cambios significativos en los niveles de IGF-I en hipocampo.

Los niveles de IGF-I en hipocampo de las hembras normales de mediana edad no cambian después de realizar ejercicio, lo que contrasta con lo previamente observado en hembras jóvenes (ver Figura 12). Posteriormente analizamos los niveles de ansiedad y

observamos que en hembras de mediana edad el ejercicio forzado produce un efecto ansiogénico (Figura 28), mientras que en hembras jóvenes no modifica los niveles de ansiedad (ver Figura 6B)

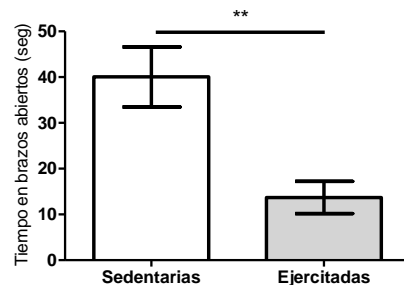


Figura 28 Modulación de los niveles de ansiedad por el ejercicio físico en hembras de mediana edad. Se contabilizó el tiempo en los brazos abiertos del laberinto de brazos cruzados. Las hembras ejercitadas muestran mayores niveles de ansiedad en comparación con las hembras sedentarias.

Además comparamos el comportamiento depresivo a nivel basal en hembras jóvenes y de mediana edad a base de someterlas a un estrés agudo (Nado Forzado). Observamos que las hembras de mediana edad tienen un comportamiento menos depresivo en comparación con las hembras jóvenes (Figura 29).

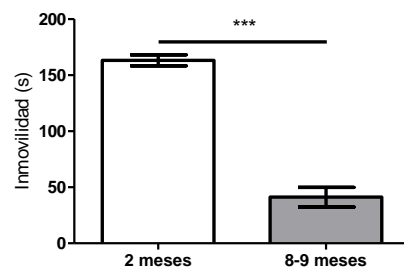


Figura 29 Disminución del tiempo de inmovilidad en hembras normales de mediana edad: Las hembras de mediana edad presentan un comportamiento menos depresivo que las hembras jóvenes. Se analizaron los últimos 4 minutos de la prueba de nado forzado de un total de 6 minutos. Solo se contabilizó el tiempo de inmovilidad. T de Student *** $p < 0.0005$

También exploramos el efecto del ejercicio en la resistencia al estrés. Las hembras de mediana edad ejercitadas no muestran una resistencia aumentada al estrés tal como ocurre en hembras jóvenes (ver Figura 7A). Además, observamos que el ejercicio, no solo no aumenta la actividad física como en hembras jóvenes, sino que la disminuye (Figura 30)

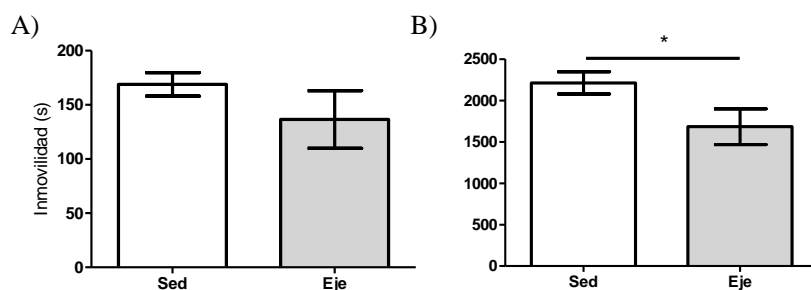


Figura 30 Resistencia al estrés tras ejercicio en hembras de mediana edad. A) Tiempo de inmovilidad en el test de suspensión por la cola. B) Actividad horizontal en el actímetro. El ejercicio físico no proporciona resistencia al estrés en hembras de mediana edad además de disminuir su actividad. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad en los últimos 4 minutos de la prueba de suspensión por la cola y se midió la actividad horizontal con los actímetros durante 5 minutos. T de Student * $p < 0.05$.

Como nuestros resultados in vitro y en hembras jóvenes indican que las hormonas ováricas modulan la captura de IGF-I en el cerebro a través del endotelio, tratamos ratones hembra de mediana edad con el agonista de los receptores de estrógenos alfa (PPT) con el fin de ver si se incrementa la captura de IGF-I. Una de las características del envejecimiento es que las hormonas ováricas van disminuyendo y los tratamientos con estradiol a estas edades tienen efectos secundarios adversos. Quizás tratar a las hembras de mediana edad con PPT podría ser una alternativa, y así comprobar si la activación del receptor alfa es capaz de recuperar las funciones perdidas. Primero miramos el efecto de PPT en los niveles de ansiedad (Figura 31).

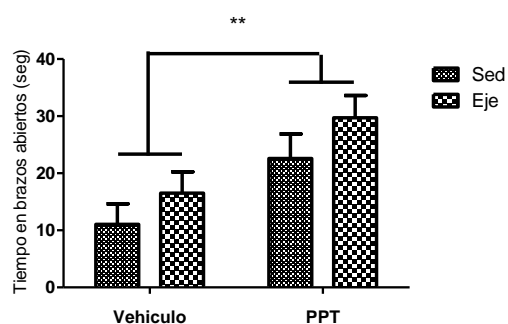


Figura 31 Niveles de ansiedad en hembras de mediana edad tratadas con PPT
Después de dos semanas del tratamiento con PPT las hembras de mediana edad muestran una reducción en los niveles de ansiedad comparadas con el grupo tratado con vehículo. Se contabilizó el tiempo en los brazos abiertos del laberinto de brazos cruzados. Anova 2 vías ** $P < 0.005$.

La activación del receptor alfa en hembras de mediana edad tiene un efecto ansiolítico independientemente del ejercicio, mientras que en las hembras jóvenes la inhibición del receptor alfa no altera los niveles de ansiedad (Figura 23). Esto sugiere que la activación del receptor alfa en hembras de mediana edad pone en marcha mecanismos ansiolíticos dependientes de la edad, abriendo una ventana a tratamientos edad-dependientes.

Otro de los parámetros que cambian con la edad según nuestros datos es la resistencia al estrés, por eso también analizamos el efecto del tratamiento con PPT en hembras de mediana edad con o sin ejercicio.

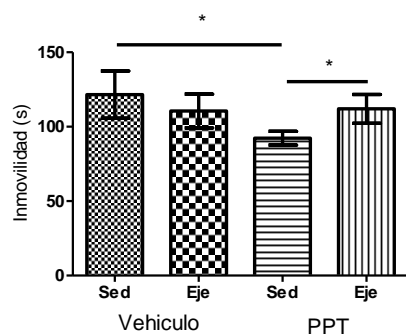


Figura 32 La activación de los receptores alfa modifica la resistencia al estrés. La activación del receptor alfa, proporciona resistencia al estrés solo en hembras sedentarias. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad en los últimos 4 minutos de la prueba de suspensión por la cola. T de Student * $P < 0.05$.

El tratamiento con PPT proporciona resistencia al estrés solo a las hembras sedentarias, pero no si se combina con ejercicio físico.

Un día después de realizar el test de suspensión por la cola sacrificamos a los ratones para medir los niveles de IGF-I en el hipocampo y verificar si correlacionan con la resistencia al estrés como en las hembras jóvenes.

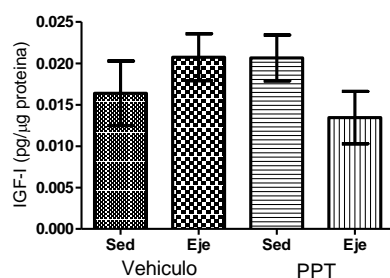


Figura 33 Niveles de IGF-I en hipocampo de hembras de mediana edad tratadas con PPT. No se observaron cambios significativos en los niveles de IGF-I, aunque hay una tendencia a aumentar en sedentarias tratadas con PPT y a disminuir en las ejercitadas tratadas con PPT. Se administró el agonista del receptor alfa (1mg/Kg) a hembras intactas de mediana edad cada dos días vía subcutánea después de realizar ejercicio durante dos semanas. T de Student $p < 0.06$.

Los niveles de IGF-I no varían con el tratamiento del agonista del receptor de estrógenos alfa, pero se observa una tendencia a que los niveles de IGF-I correlacionen con la conducta demostrada: disminución en los niveles de IGF-I en las hembras del grupo PPT que realizaron ejercicio, y que probablemente tenga relación con la ausencia de mejora en la resistencia al estrés en este grupo en particular y aumento tras ejercicio en tratadas con vehículo y en sedentarias tras PPT, ambos grupos con tendencias a tener menos ansiedad.

Hembras APP/PS1 de mediana Edad

Por otro lado analizamos los mismos parámetros en hembras APP/PS1 de la misma edad. Es de notar que estos animales, tras ejercicio forzado, los niveles de IGF-I hipocampal, en vez de no modificarse como en hembras normales, son algo más bajos (Figura 34).

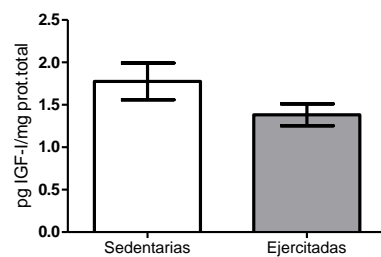


Figura 34 Niveles de IGF-I en hipocampo de hembras APP/PS1 de mediana edad. El ejercicio físico tiende a disminuir los niveles de IGF-I en hipocampo en los ratones hembra APP/PSI. Los niveles de IGF-I fueron analizados mediante ELISA después de dos semanas de ejercicio forzado. T de Student $p < 0.06$.

Mientras que en las hembras normales después de realizar ejercicio los niveles de ansiedad incrementan (ver figura 28) en las hembras APP/PS1 ejercitadas no hay cambios en los niveles de ansiedad. (Figura 35).

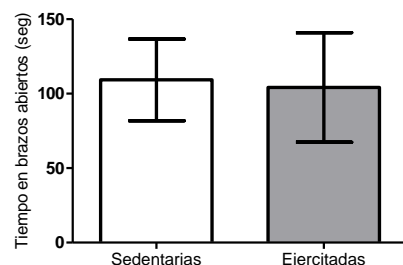


Figura 35 El ejercicio no modifica los niveles de ansiedad en hembras APP/PS1 de mediana edad. Se contabilizó el tiempo en los brazos abiertos del laberinto de brazos cruzados después de dos semanas de exposición a la banda para correr.

En cuanto a la resistencia al estrés, el ejercicio forzado incrementa significativamente el tiempo de inmovilidad en hembras de mediana edad APP/PS1, lo que está relacionado con un comportamiento depresivo (Figura 36).

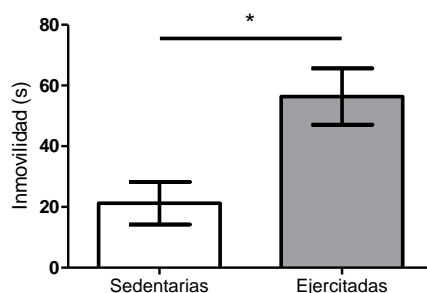


Figura 36 El ejercicio disminuye la resistencia al estrés en hembras APP/PS1 de mediana edad. Las hembras ejercitadas pasan más tiempo inmóvil que las sedentarias. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad en los últimos 4 minutos de la prueba de suspensión por la cola. T de Student * $p < 0,05$.

Para evitar la posible interferencia emocional de forzar a hacer ejercicio a estas hembras APP/PS1 de mediana edad especialmente sensibles a éste, como se ha reportado que el ejercicio voluntario no produce estrés (Yanagita et. al. 2007), analizamos los niveles de IGF-I en hembras APP/PS1 después de tres meses de ejercicio voluntario (Figura 37).

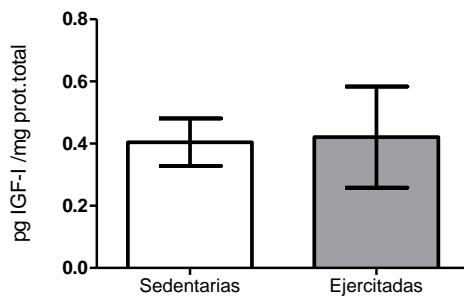


Figura 37 Niveles de IGF-I en corteza de hembras APP/PS1 de mediana edad: Los ratones permanecieron en jaulas con libre acceso a una rueda para hacer ejercicio después de tres meses medimos los niveles de IGF-I mediante ELISA. No hay cambios significativos entre grupos.

Los niveles de IGF-I en las hembras ejercitadas no muestran diferencias comparados con las hembras sedentarias; pero en comparación con el grupo de ratones APP/PS1 de ejercicio forzado (ver Figura 29) donde hay una tendencia a disminuir los niveles de IGF-I, el ejercicio voluntario parece no tener un efecto directo en los niveles de IGF-I; lo que sugiere que el estrés al realizar una actividad forzada puede modificar los niveles de IGF-I en el cerebro.

Discusión

Resulta llamativo comprobar que los efectos del ejercicio físico pueden presentar dimorfismo sexual. Así, por ejemplo, Baker & col. en un estudio sugieren que la diferencia sexual en la respuesta cognitiva puede estar relacionado con diferencias sexuales en el metabolismo de la glucosa y en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal en respuesta al ejercicio físico (Baker et. al. 2010); Carek & col observaron que el ejercicio físico mejora el estado de ánimo en casos de ansiedad y depresión de forma diferencial entre sexos (Carek et. al. 2011); exhaustivas revisiones de ensayos clínicos realizadas por Herring & col. y Stonerock & col. (Herring et al.2010; Stonerock et. al. 2015) permiten llegar a la conclusión de que realizar ejercicio físico moderado durante 30 minutos tiene efectos ansiolíticos, existiendo una diferenciación en función de la edad y el género; y Duman & col. llevaron a cabo estudios en roedores que aportan evidencia del efecto del ejercicio en el comportamiento emocional (Duman et al.2008), estando bien documentado la existencia de diferencias sexuales en este comportamiento (Gray y Lalljee 1974; Archer 1975). No obstante, estas observaciones contrastan con la realizada por Rejeski & col., quienes no vieron este efecto dependiente del sexo en el estado de ánimo (Rejeski et. al. 1995). Por otro lado, Auer & col. y Malberg & col. han reportado sobre la implicación de IGF-I en el estado de ánimo (Auer et al 2003; Malberg et al. 2007), aunque no existe investigación documentada sobre si se produce un dimorfismo sexual en sus efectos.

DIMORFISMO SEXUAL EN LA MODULACIÓN DEL ESTADO DE ÁNIMO POR EL EJERCICIO FÍSICO

Como resultado de la prueba del laberinto elevado de brazos cruzados, se han obtenido datos que indican que las hembras muestran menos ansiedad en comparación con los machos (ver Figura 6), comportamiento que coincide con lo publicado previamente por Farabollini & col. y Johnston & File (Farabollini et. al 1987; Johnston y File 1991). Sin embargo, al analizar los niveles de ansiedad en ratones ejercitados, observamos que el ejercicio físico tiene un efecto ansiolítico sólo en los machos, mientras que en las hembras no se han registrado cambios.

El mecanismo por el cual el ejercicio disminuye los niveles de ansiedad, en el caso de los machos, sigue sin quedar establecido, debido a que hay datos contradictorios. Así,

por ejemplo, en relación al efecto de las hormonas gonadales, se ha descrito que los andrógenos afectan al estado de ánimo. No obstante, se han obtenido diferentes respuestas en los niveles de ansiedad y depresión dependiendo de la prueba realizada (Celec et. al. 2015).

Por otro lado, la ausencia de cambios en los niveles de ansiedad tras el ejercicio en hembras concuerda con lo ya observado por Brocardo & col., quienes han reportado que el ejercicio en ratas hembra no tiene efecto sobre los niveles de ansiedad (Brocardo et al. 2012). Esto puede deberse a que el ejercicio físico no modifica los ya de por sí bajos niveles de ansiedad en hembras (Johnston y File 1991), pudiéndose atribuir tal comportamiento en parte a las hormonas ováricas, ya que observamos que las hembras ovariectomizadas presentan mayores niveles de ansiedad que las hembras intactas. Este efecto ansiolítico de las hormonas ováricas concuerda con lo previamente reportado por Bowman & col. (Bowman et. al. 2002). Asimismo, también corroboramos que los niveles de ansiedad en hembras jóvenes están modulados específicamente por el receptor beta del estradiol (Lund et. al. 2005; Kudwa et. al. 2014), ya que al bloquear los receptores alfa durante el entrenamiento no hay cambios significativos en dichos niveles.

La atención o estado de alerta

Es sabido que el ejercicio físico y las hormonas sexuales modulan, no sólo los estados de ánimo, sino también los niveles de atención o alerta (Hoshaw et. al. 2005; Easton et al 2004; Tsai et. al. 2014). En el estudio realizado empleando el actímetro (ver Figura 9) observamos que el estado de alerta modulado por un estímulo vestibular se ve incrementado sólo en las hembras intactas ejercitadas, y que este efecto es suprimido en hembras ovariectomizadas. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por Mong & col., quienes concluyeron que sólo la modulación vestibular del nivel de atención es dependiente de los estrógenos (Mong et. al. 2003), lo que explicaría que sólo observemos diferencias con este tipo de estímulo y no con otros, como son el olfativo y el táctil. Además, nuestros resultados también concuerdan con lo ya reportado por Garey & col., quienes recogen en su artículo que el estado de alerta está disminuido en hembras carentes del receptor alfa de estrógenos (Garey et. al. 2003). Estas

evidencias sugieren que la activación del receptor alfa por el ejercicio incrementa el estado de alerta y que la ausencia o inactividad de estos receptores disminuyen dicho estado.

Adicionalmente, en el mismo ensayo de alerta (ver Figura 36) observamos que en hembras LID ejercitadas con un 70% menos de IGF-I circulante no se registra un incremento de la actividad con ninguno de los estímulos proporcionados, por lo que se puede concluir que es necesario también IGF-I para modular el nivel de atención o alerta mediante el ejercicio.

Resistencia al estrés

Hay diversos estudios que apoyan la existencia de un dimorfismo sexual ante la respuesta al estrés (Yuen et. al. 2016). Como una primera aproximación al estudio del control del estrés en ratones C57, comparamos los niveles de miR-375 extraído del hipocampo de machos y hembras, ya que este microARN está relacionado directamente con la capacidad de modulación del organismo de los niveles de estrés. La función del miR-375 puede estar relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Poy et. al. 2008), ya que se produce una desregulación del metabolismo de la glucosa cerebral como respuesta al estrés. El hecho de que en las hembras los niveles de miR-375 sean menores en comparación con los medidos en los machos (ver Figura 7), sugiere que las hembras podrían ser más resistentes al estrés.

Asimismo, las pruebas de comportamiento, como son el nado forzado y la suspensión por la cola, se suelen usar para ver el efecto ansiolítico de fármacos en roedores y para la detección de comportamiento depresivo (Porsolt et. al. 1977, Steru et. al. 1985). Además, aunque de una manera menos extendida, este tipo de pruebas también se han empleado para estudiar el efecto del ejercicio físico en el estado de ánimo (Duman et. al. 2008). Como es frecuente en este campo, se han reportado datos que presentan discrepancia con respecto al tiempo de inmovilidad, parámetro medido en las pruebas de comportamiento que se utiliza como indicador de niveles de depresión. Así, por ejemplo, Consoli & col. han observado que las ratas hembra durante las fases de proestro y estro presentan un mayor tiempo de inmovilidad que en la fase de diestro (Consoli et. al. 2005). Sin embargo, Contreras & col. sugieren que las hembras

muestran una actividad incrementada en las fases de proestro o estro (Contreras et. al 1998). Por otro lado, una observación llevada a cabo de una manera más unánime dentro de este área es que, sin importar la fase del ciclo estral, las hembras presentan en general mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los machos (Allen et. al 2012). Estas observaciones concuerdan con los datos obtenidos en ratones sedentarios (ver Figura 8), donde las hembras presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar un comportamiento depresivo que los machos. No obstante, sólo las hembras ejercitadas desarrollan una mayor resistencia al estrés después de haber estado realizando ejercicio físico durante dos semanas, lo que está en consonancia con el hecho de que presenten niveles más bajos de miR-375. Por lo tanto, este microARN se podría considerar un biomarcador de resistencia al estrés, sin embargo harían falta más estudios para poder confirmarlo.

Existe evidencia de que en los machos el ejercicio forzado disminuye los niveles de estrés y ansiedad, actuando además como agente neuroprotector (Greenwood et. al. 2013), aunque esto depende del tiempo de ejercicio físico al que se es sometido. Así, por ejemplo, una semana de ejercicio no modifica el tiempo de inmovilidad en los test de nado forzado o suspensión por la cola (Duman et. al. 2008), pero después de cuatro semanas de ejercicio físico se atenúan los efectos secundarios de ansiedad y depresión (Motaghinejad et. al. 2015). En este último caso, se ven incrementados los niveles de BDNF y del receptor de serotonina en el hipocampo de ratas estresadas (Kim et. al. 2015). En el estudio realizado en este Trabajo (ver Figura 8B) se ha sometido a los ratones a 2 semanas de ejercicio, pudiendo resultar dicho tiempo insuficiente para que se produzcan cambios en la resistencia al estrés en los machos.

Con respecto al papel que juegan las hormonas ováricas en mecanismos de resistencia al estrés, existen diversos estudios y observaciones que no permiten llegar a una visión unificada. Así, Wei & col. en un estudio afirman que el estradiol proporciona resistencia al estrés sólo en ratas hembra y no en machos, por vías glutamatérgicas en la corteza prefrontal (Wei et. al. 2014). Sin embargo, Vega & col. sugieren que la acción antidepressiva de los compuestos que emulan al estradiol implica mecanismos complejos en el sistema monoaminérgico y receptores de estrógenos (Vega et. al 2013).

De acuerdo con Arató M. & col., los altos niveles de serotonina en el cerebro de las mujeres pueden proporcionar al mismo las bases fisiológicas para tener un mayor control sobre el estado de ánimo (Arató et. al. 1991). En este sentido, Brundin & col. afirman que la vulnerabilidad al estrés está relacionada con desórdenes del estado de ánimo y con la hipofunción del sistema de orexina (Brundin et. al. 2007, 2009), y, en el caso de este último, con respuestas sexualmente dimórficas al ejercicio. Por lo tanto, se puede concluir que la existencia de una relación compleja de las hormonas ováricas con distintos sistemas de neurotransmisión implicados en el control del estado de ánimo, complica mucho nuestra capacidad de comprender con claridad su papel.

En cuanto a la relación de IGF-I y estradiol en la modulación de la resistencia al estrés, demostramos su papel conjunto como mediadores en la modulación ejercida por el ejercicio físico en ratones hembra. Para llegar a esta conclusión, empleamos ratones mutantes con bajos niveles séricos de IGF-I (ratones LID) y ratones control tratados con un antagonista del receptor de estrógenos alfa (ver Figura 25). De esta forma, pudimos comprobar que la deficiencia de IGF-I sérico o la inactividad del receptor de estrógenos alfa bloquean el efecto beneficioso del ejercicio físico sobre la capacidad de resistencia al estrés. Por lo tanto, podemos afirmar que el IGF-I sérico y el estradiol vía receptor alfa son necesarios para desarrollar resistencia al estrés en ratones hembra ejercitadas. Dichas observaciones concuerdan con las de Wei & col., quienes, al igual que nuestro grupo de investigación, registraron que los receptores de estrógenos mejoran la respuesta ante el estrés (Wei et. al. 2014). Todas estas evidencias sugieren que los mecanismos en machos y hembras para mantener la homeostasis del estado de ánimo son diferentes, e IGF-I es un excelente candidato para estudiar estas diferencias del género.

DIMORFISMO SEXUAL EN LA MODULACIÓN DE IGF-I HIPOCAMPAL POR EL EJERCICIO FÍSICO

En referencia a los niveles de IGF-I en el hipocampo, observamos un dimorfismo sexual en ratones jóvenes sedentarios que puede deberse al “organizational period” o “periodo organizativo” que ejercen los esteroides gonadales durante la diferenciación sexual del cerebro a lo largo del desarrollo (ver Figura 11). Adicionalmente, registramos cambios dependientes en las hormonas ováricas sobre los niveles de este factor de crecimiento en

el cerebro como respuesta al ejercicio (ver Figura 15). Así, en el caso de los machos, observamos que el entrenamiento durante dos semanas no produce cambios significativos en los niveles de IGF-I en el hipocampo (ver Figura 11), siendo concordante con lo reportado anteriormente en bibliografía (Trejo et. al. 2008; Yue et al. 2014). Por otro lado, Malberg & col. demostraron que a partir de la inhibición de las proteínas de unión a IGF (IGFBP), se da un incremento de IGF-I. Del mismo modo, en el caso de administrar este factor de crecimiento, se producen efectos ansiolíticos y antidepresivos en ratones machos por el incremento de los niveles de IGF-I en el cerebro (Malberg et. al. 2007). Estas diferencias con respecto al comportamiento de este péptido se pueden interpretar de distintas maneras. Por una parte, puede ser que, a diferencia de lo visto en ratones hembra, el ejercicio resulte ansiolítico en ratones macho por mecanismos en los que no participe el IGF-I. Una segunda explicación alternativa es que nuestras condiciones experimentales (tiempo y tipo de ejercicio, etc.) no permitieron detectar cambios en los niveles hipocámpales de IGF-I, pero que este factor sí tenga un papel activo en los efectos del ejercicio físico. Esta segunda posibilidad viene sustentada por observaciones de modificaciones muy locales de IGF-I que pueden ser indetectables a nivel tisular (Mardinly et. al, 2016). Y, por último, una tercera posible explicación es que el IGF-I tiene un efecto automodulador sobre sus niveles cerebrales (Trueba-Saiz et. al. 2016). Con respecto a esta última, comprobamos que, en concordancia con los resultados obtenidos en hembras tras dos semanas de ejercicio (ver Figura 11), al entrar más IGF-I desde la sangre al cerebro, éste tiende a disminuir los niveles de este factor de crecimiento. No obstante, es necesario indicar que habría que realizar experimentos a diferentes tiempos con el fin de confirmarlo, ya que, después de 4 semanas de ejercicio, se observa un incremento de IGF-I en machos C57 (Trejo et. al. 2008). Esto sugiere que los niveles de IGF-I fluctúan de acuerdo a la duración e intensidad del ejercicio físico.

Xiao & col. han reportado que en ratones que nadaron durante 21 días los niveles del mensajero de IGF-I en corazón e hígado se ven incrementados en comparación con ratones sedentarios (Xiao et. al. 2014). Esto sugiere que dos semanas de ejercicio moderado, tal como usamos y registramos en nuestros experimentos (ver Figura 17), no es suficiente para incrementar los niveles del mensajero de IGF-I en hígado, y que

probablemente se requieran más días de ejercicio físico para poder visualizar un incremento en los niveles del factor de crecimiento tanto en hígado como en hipocampo.

Otra variable a tener en cuenta es la alimentación a la que es sometido el sujeto, debido a que el tipo de dieta es un potencial elemento modulador de IGF-I. Así, por ejemplo, las altas concentraciones del neuropeptido Y (potente modulador del apetito) después del ejercicio, disminuyen los niveles de insulina e IGF-I en deportistas durante un ejercicio intenso y prolongado (Zajadacz et. al. 2009). Además, la combinación de ejercicio con una dieta baja en grasas reduce los niveles de IGF-I circulante en hombres sanos (Barnard 2007). Por lo tanto, con un control sobre la dieta y el ejercicio adecuado, se puede modificar los niveles de IGF-I en machos a niveles deseados.

Con respecto a las hembras, nuestros registros indicaron que la entrada de IGF-I circulante al cerebro a través de la barrera hematoencefálica es regulado por estradiol (ver Figura 22). Además, observamos que la activación del receptor alfa de estradiol en células endoteliales de los vasos cerebrales estimula la presencia en membrana plasmática del receptor de IGF-I, lo que favorece su captura del torrente circulatorio (ver Figura 19). Asimismo, se ha reportado que existe un marcado dimorfismo sexual en la concentración de IGFBP3 en el plasma (Emeny et. al. 2014), lo que puede favorecer indirectamente una diferencia en los niveles de este factor de crecimiento en el cerebro ya que IGFBP3 es la principal proteína transportadora de IGFs en el plasma (Baxter et al 1989). Adicionalmente, confirmamos la participación de las hormonas gonadales en las hembras, ya que después de la ovariectomía el efecto del ejercicio sobre el paso de IGF-I circulante al cerebro es anulado (ver Figura 16). Esto se debe a que, en las hembras ovariectomizadas, los niveles del receptor de estrógenos alfa ($ER \alpha$) en el endotelio (Stirone et. al. 2003) y en la corteza cerebral (Asaithambi et. al. 1997) se han visto disminuidos, adicionalmente con la ausencia de estrógenos el receptor de estrógenos alfa se encuentra ubiquitinado (Wijayaratne y McDonnell 2001). Por lo tanto, se puede deducir que los bajos niveles del receptor de estrógenos alfa en el endotelio cerebral afectan directamente al paso del IGF-I circulante en hembras ovariectomizadas. Asimismo, tal y como indican Bohacck & col., la expresión de $ER \alpha$ se ve comprometida o afectada un mes post ovariectomía (Bohacck et al. 2009).

Por otra parte, al analizar los niveles de estradiol en el suero de los ratones hembra que realizaron ejercicio, observamos una disminución de dichos niveles en comparación con los medidos en ratones sedentarios (ver Figura 22 C). Esto ya se ha reportado también en mujeres; al hacer ejercicio físico los niveles de E2 disminuyen en suero, aunque hay que matizar que esto se ha observado sólo en aquellas que presentan pérdida de grasa corporal (Monninkhof et. al. 2009). Una posible explicación a tal fenómeno es que el ejercicio puede disminuir los niveles circulantes de estrógenos, a base de incrementar los niveles de la proteína globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) que se une al estradiol libre en suero, por lo que SHBG puede regular la biodisponibilidad de estrógenos circulantes (McTiernan et al 2004). Del mismo modo, el ejercicio frecuente regula el balance energético y previene la acumulación de reservas de adipocitos y, consecuentemente, influye en la producción de estrógenos.

Comentario [Eva1]: Referencia?

Dependiendo del tipo de ejercicio realizado, se generan diferentes respuestas. Una de las ventajas de estudiar el ejercicio agudo es que proporciona evidencias que pueden ayudar a entender mejor los mecanismos del ejercicio en un corto plazo. Al someter a los ratones a este tipo de ejercicio, observamos una tendencia a incrementar los niveles de IGF-I sólo en machos, mientras que en hembras no se obtuvieron cambios significativos. Esto podría explicarse apoyándonos en lo reportado por Hojo & col., quienes observaron que los niveles de estradiol en el hipocampo de los machos son superiores a los niveles encontrados en las hembras (Hojo et. al. 2009). Así, el ejercicio agudo, en machos, induciría la entrada de IGF-I sérico gracias a la mayor cantidad de estradiol presente, lo que concuerda con el mecanismo de captura de este factor de crecimiento modulado por estradiol, aunque el origen de esta hormona sea diferente. Asimismo, esto podría reforzar la idea de que, al incrementar los niveles de IGF-I, estos tiendan a disminuir para mantener una homeostasis en el cerebro, y, por lo tanto, puede explicar que, después de dos semanas de ejercicio, no veamos incremento de los niveles de este factor en machos.

Regulación de la captura de IGF-I en células endoteliales del cerebro por estradiol

Como posible mecanismo implicado en una mayor entrada de IGF-I sérico al hipocampo tras efectuar ejercicio físico, sólo en el caso de ratones hembra, estudiamos el papel del estradiol en las células que constituyen la barrera hematoencefálica (ver Figura 18). Como resultado encontramos que, sólo en el endotelio cerebral, el estradiol vía receptores alfa, estimula la captura de IGF-I, mientras que en células epiteliales del plexo coroideo, otra vía de entrada de IGF-I al cerebro, el estradiol no ejerce efecto alguno detectable. Sin embargo, esta hormona sí ejerce efecto en otras rutas, tales como la de GSK3 beta, lo que indica que estas células son modulables por otras vías distintas a los estrógenos (Bolós et al. 2009).

Asimismo, en los cultivos sexuales de endotelio cerebral, el estradiol incrementa la captura de IGF-I biotinilado con una respuesta similar para ambos sexos, indicando que éste no es un factor determinante (ver Figura 18 C). Por otro lado, Mukai & col. observaron, al analizar las rodajas de cerebro de los sujetos, que el estradiol produce los mismos efectos en ratones macho y en hembras ovariectomizadas (Mukai et. al. 2007). Por lo tanto, se puede concluir que son la actividad y disponibilidad del estradiol circulante los factores determinantes en las diferencias sexuales observadas en la captura post-ejercicio de IGF-I periférico y no unas diferencias intrínsecas al endotelio cerebral de hembras y machos.

El incremento de la captura de IGF-I biotinilado por las células endoteliales en respuesta a estradiol es probable que se deba a un incremento de los niveles del receptor de IGF-I en estas células. Dicho incremento puede estar mediado por las acciones rápidas no genómicas que han sido descritas para E2 a través de su receptor en membrana (Beyer et al.2003; Ronnekleiv et al.2007). Estos incluyen la formación de complejos multi-moleculares IGF-IR-ER alfa-p85-IRS1 (McTiernan et al 2003). Por lo tanto, la captura rápida de IGF-I por las células endoteliales tratadas con E2 sugiere que éste usa un mecanismo de acción diferente a la vía genómica.

Otro mecanismo potencialmente involucrado en la captura del IGF-I es la capacidad de este factor de crecimiento de activar ER α al ser inyectado intra-ventricularmente en el hipocampo en ausencia de estrógenos gonadales (Grissom et. al. 2016). Esto sugiere que

el IGF-I sería capaz de automodular su captura independientemente de estrógenos en endotelio cerebral. No obstante harían falta más estudios y ensayos para confirmar esta idea.

Incremento de la actividad de los receptores de estrógenos en el cerebro por el ejercicio físico

En el caso de las hembras ejercitadas, utilizando un pan-reportero de la actividad del receptor de estrógenos, observamos un incremento significativo de dicha actividad (medido como expresión de GFP) en comparación con las hembras sedentarias (ver Figura 22^a y 22B). Estos datos permiten sugerir que el estradiol actúa a nivel de endotelio cerebral durante el ejercicio para activar los receptores alfa en el endotelio (Stirone et al 2003). Asimismo, también se ha reportado que los receptores de estrógenos son capaces de unirse al promotor ERES (Elemento de Respuesta a Estrógenos) sin previa unión a su ligando. Además, cuando se une estradiol a sus receptores, la unión es más fuerte entre los receptores alfa y los ERES comparada con los receptores beta (Yi et. al 2002; Huang et. al 2006). Por lo tanto, podemos pensar que la expresión de GFP proviene mayoritariamente de la unión de ER alfa y EREs, lo que concuerda con lo estudiado in vitro sobre la interacción de IGF-I y estradiol vía ER alfa (ver Figura 20). Sin embargo, observamos que los niveles de estradiol disminuyen después de hacer ejercicio. Aunque de una manera puramente especulativa, las investigaciones sugieren que la disminución en los niveles de estradiol se pueden deber a una mayor entrada de estradiol sérico a órganos diana como el cerebro. Así, estos resultados proponen que el incremento de IGF-I en el hipocampo de las hembras que realizaron ejercicio físico se debe a un incremento de la actividad de los ER alfa modulada por los estrógenos, lo que facilita el paso de IGF-I periférico al hipocampo, y, muy probablemente, a todo el cerebro.

Ciclo estral e IGF-I

La fluctuación de los niveles de IGF-I en hipocampo durante el ciclo estral, específicamente en las fases de proestro y diestro, pero no de su ARN mensajero,

sugiere que estos cambios transitorios se deben a la entrada de IGF-I circulante. Esto se apoya en que no observamos cambios en los niveles de este factor de crecimiento en hipocampo de ratones LID durante las mismas fases del ciclo estral (ver Figura 14). Estos resultados pueden relacionarse con los datos obtenidos por Kato & col., en donde se puede ver que en el hipocampo los niveles de estradiol cambian durante el ciclo estral, lo que modularía la entrada de IGF-I (Kato et. al. 2013). Es interesante en este sentido la observación de que el incremento de la expresión de este factor en el hipotálamo preserva el ciclo estral y una histología normal en los ovarios de ratas de mediana edad (Rodríguez et. al. 2013), lo que indica que el estradiol modula fisiológicamente la entrada de IGF-I periférico al cerebro para mantener el dicho ciclo en condiciones normales. Por lo tanto, estas evidencias refuerzan lo observado en relación a la falta del efecto del ejercicio físico en las hembras ovariectomizadas y la activación de los receptores alfa utilizando el reportero de los EREs en ratones hembra ejercitadas.

En el presente Trabajo observamos que es necesaria la interacción entre IGF-I y hormonas ováricas para mantener el funcionamiento del estado del ánimo específicamente a través del receptor alfa de estrógenos en hembras. Esto indicaría que en ratones jóvenes las hormonas gonadales podrían estar influyendo en el estado de ánimo por vías diferentes dependiendo del género.

EL FACTOR EDAD Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La relación entre IGF-I y estradiol que observamos en ratones hembra jóvenes en el estado de ánimo tras ejercicio físico, puede estar modulada por la edad, y por lo tanto puede estar implicada en procesos de envejecimiento en mujeres. Se han observado diferencias sexuales en IGF-I en neonatos y ancianos (Wiley et. al 2016; van Varsseveld et. al. 2015), indicando que IGF-I tiene un papel importante en diferentes etapas de la vida y que éste varía dependiendo del género. También se ha reportado que el ejercicio anaeróbico mejora el estado de ánimo en ancianos, pero solo en estudios con hombres se ha correlacionado con niveles altos de IGF-I en suero (Cassilhas et al. 2010; Tsumumi et al. 1998).

Tanto en hombres como en mujeres uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar la enfermedad de Alzheimer es la edad (Reitz et al. 2010). En mujeres hay que añadir también la disminución de hormonas gonadales tras la menopausia como factor de riesgo (Rocca et. al. 2007; Vest y Pike 2013). Es interesante enfatizar que son las mujeres postmenopáusicas la población con mayor prevalencia de Alzheimer (Hebert et. al. 2001), con un cuadro clínico y patológico más severo que en hombres (Filon et. al. 2016), y un cerebro más vulnerable a la enfermedad (Hua et. al. 2010).

Comúnmente a la desregulación del ciclo menstrual en mujeres activas o del ciclo estral en roedores que realizan ejercicio forzado, se le ha atribuido un desbalance de la hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, lo que afecta a la hormona luteinizante y por lo tanto a las hormonas ováricas. Para poder explicar este fenómeno fisiológico se han postulado algunas hipótesis como la hipótesis de la composición de cuerpo, hipótesis del estrés, y la hipótesis de disponibilidad energética; estas conjeturas están basadas en observaciones puntuales, pero se concluye que es necesario cubrir las necesidades energéticas resultantes de la actividad física por ejemplo: Leptina (hipótesis de la composición del cuerpo) está involucrada en la señalización de la ingesta y en la desregulación del eje HPA, así como, se ha comprobado que se reducen los niveles de cortisol en respuesta al ejercicio, al suplementar con glucosa la dieta (hipótesis del estrés), además es necesario que la dieta cubra en su totalidad el gasto energético resultante de la actividad física, para disminuir los efectos negativos del ejercicio físico en mujeres de mediana edad (hipótesis de disponibilidad energética) (Louks A 2003). Estas necesidades energéticas en esta población pueden deberse a que se han reportado cambios significativos en el metabolismo de estrógenos mediados por el ejercicio físico en mujeres premenopausicas sanas (Smith et al 2013), y a una correlación negativa entre la actividad física y los niveles circulantes de estrógeno que puede estar mediada por la disminución de tejido adiposo; la principal fuente de estrógenos en mujeres postmenopáusicas.

Por lo previamente expuesto estudiamos el efecto del ejercicio físico en el estado de ánimo de ratones hembra normales y APP/PS1 (modelo de la enfermedad de Alzheimer) de mediana edad, es decir, en etapas peri-menopáusicas. Con estos modelos se puede estudiar los factores de riesgo como edad, la disminución de IGF-I y las hormonas ováricas en la enfermedad de Alzheimer, además de la pérdida de

resistencia en el cerebro envejecido a las respuestas a estrés (Juster et. al. 2010), que puede estar relacionado con la enfermedad de Alzheimer.

Observamos que la edad modifica todos los parámetros que hemos analizado en hembras jóvenes. Entre estos, el ejercicio físico no es capaz de incrementar los niveles de IGF-I en el hipocampo, lo cual puede tener relación con la observada modificación de la conducta en hembras de mediana edad. Si nos ceñimos a lo observado en hembras jóvenes, es necesaria la activación del receptor de estrógenos alfa tras ejercicio físico para incrementar la captura de IGF-I sérico; por lo tanto, la ausencia de efecto del ejercicio físico sobre niveles de IGF-I observada en hembras de mediana edad puede explicarse por la reportada disminución de la expresión de receptores alfa en el endotelio (Sandoval y Witt 2011) y por la ausencia de respuesta de los receptores alfa en hembras de mediana edad a estrógenos (Bohacek et. al. 2009). Por otra parte la intensidad del ejercicio físico es un factor a tener en cuenta, porque realizar ejercicio físico extenuante sin previa preparación empeora el estado de ánimo (Salmon 2001), y puede que la tolerancia a ejercicio sea menor en hembras de mediana edad. Tal vez un protocolo menos intenso pueda proporcionar mejores resultados en el estado de ánimo en hembras de mediana edad. Como dato a tener en cuenta, las hembras no realizaron ninguna actividad física hasta llegar a los 8-10 meses.

En relación al estado de ansiedad en este grupo experimental, observamos que el ejercicio físico vuelve más ansiosas a las hembras de mediana edad. Recientemente se está relacionando la mediana edad con mayores niveles de ansiedad. Según la Oficina Nacional de Estadística de Reino Unido (2012-2015) las mujeres de mediana edad suelen padecer niveles altos de ansiedad. Esta relación también se ha observado en otras poblaciones (Bansai et. al. 2015; Pimenta et. al. 2016). Una posible explicación es que el ejercicio físico acrecienta esta condición, Cameron ha descrito que el ejercicio físico incrementa los niveles de ansiedad en pacientes con desordenes de ansiedad (Cameron et al., 1986). Pero hacen falta estudios a largo plazo para poder ver si la adaptación al ejercicio es un factor importante en la regulación de los niveles de ansiedad en hembras de mediana edad.

El efecto de la edad en la prueba de natación forzada en hembras de mediana edad correlaciona con lo reportado por Shoji et. al. 2016, sugiriendo que durante el envejecimiento disminuye el comportamiento depresivo. A su vez, las hembras de mediana edad carecen de resistencia al estrés que produce realizar ejercicio físico, ya que estas hembras, en condiciones sedentarias presentan un comportamiento depresivo atenuado, no logrando reponerse al estrés después de realizar ejercicio. Esto puede deberse a que el IGF-I circulante no está entrando al cerebro como en las hembras jóvenes, debido a que los niveles de hormonas ováricas no sean los óptimos para poder llevar a cabo esta acción, o porque con la edad, tanto los niveles del receptor de IGF-I y del receptor de estrógenos alfa disminuyen. Mahmoud plantea que la ausencia de hormonas ováricas en hembras de mediana edad disminuye considerablemente la resistencia al estrés en ratas tratadas con fluoxetina (Mahmoud et. al. 2016). Estas evidencias remarcen la importancia de las hormonas ováricas en los mecanismos de resistencia al estrés.

En base a los resultados obtenidos, tratamos a un grupo de hembras de mediana edad con PPT, un agonista específico del receptor de estrógenos alfa, con el propósito de solventar la bajada de estrógenos causada por la edad y así poder estimular el paso de IGF-I sérico al cerebro a través del endotelio cerebral en respuesta a ejercicio físico. De esta manera se podrían recuperar las funciones perdidas en resistencia aumentada al estrés tras el ejercicio físico.

Primero analizamos si el tratamiento con PPT modifica los niveles de ansiedad tras ejercicio físico, ya que las hembras de mediana edad muestran mayor ansiedad tras haberlo realizado. Sin embargo lo que se observó es que el PPT disminuye considerablemente la ansiedad basal, y que el ejercicio físico sigue sin ser ansiolítico. Además la activación del receptor alfa mejora la resistencia basal al estrés sin que haya diferencias significativas en los niveles de IGF-I. En este sentido es importante señalar que la ausencia de diferencias en los niveles de IGF-I se puede deber a que el diseño experimental en este caso fue modificado de tal forma que los animales se sacrificaron un día después de realizar la prueba de suspensión por la cola, y no una hora después de la última sesión de ejercicio. Adicionalmente el que haya una tendencia a disminuir los niveles de IGF-I en el hipocampo en el grupo ejercitado puede deberse al efecto automodulador tiempo-dependiente del IGF-I (Trueba-Saiz et. al., 2016), debido a una

mayor entrada de IGF-I sérico al cerebro. Pero hacen falta más experimentos para confirmar estas observaciones.

Lo realmente destacable e interesante sobre las investigaciones realizadas, es que sólo con la activación del receptor alfa de estrógenos, se logra recuperar la resistencia al estrés además de una mejora en el estado de ansiedad sin recurrir al ejercicio físico. Tal vez en un futuro esto pueda ser un tratamiento para las mujeres que se encuentran en la peri menopausia y que por las exigencias del estilo moderno de vida es difícil realizar alguna actividad física.

Alteración del estado del ánimo en ratones APP/PS1 (modelo de la enfermedad de Alzheimer).

En las hembras APP/PS1 que realizaron ejercicio, hay una tendencia a disminuir los niveles de IGF-I en el hipocampo. Esto está asociado a un incremento en los niveles de estrés en la prueba de suspensión por la cola, y además no observamos ganancia en el peso tras ejercicio, comparado con los ratones sedentarios. Esto sugiere que la intensidad del ejercicio forzado, debe ser moderada y gradual si es que se desea utilizar como tratamiento clínico para evitar los posibles efectos negativos en los pacientes con EA, porque hay estudios que indican que en estos pacientes, el incremento gradual de ejercicio moderado a intenso resulta positivo para la evolución de la enfermedad (Hoffmann et. al. 2016).

Los ratones hembras APP/PS1 que han realizado ejercicio presentan cambios negativos en su respuesta ante las mismas pruebas respecto a los ratones C57 normales. Esto indica que son más susceptibles, independientemente de la edad, lo que refuerza el hecho de que la regulación del estado de ánimo se encuentra alterado en la EA. Estos resultados correlacionan con el fenotipo hipo-metabólico que empieza en la mediana edad, cuando el ciclo estral ya no es regular en al menos el 45-50% de hembras (Zhao et. al. 2016). Estas alteraciones pueden también relacionarse con una desregulación del eje IGF-I/estradiol, incidiendo en el control del estado de ánimo.

En la actualidad se propone al ejercicio físico como terapia no invasiva en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer donde se observan

efectos beneficiosos en el cerebro. Así, después de realizar ejercicio físico voluntario se ve incrementado el volumen del hipocampo además del aclaramiento de A β (Yuede et. al. 2009 y Um HS et. al. 2008). En la mayoría de estos estudios realizados, los ratones se someten a ejercicio durante al menos 5 meses, pero no existen datos con menos tiempo. Por esto decidimos analizar los niveles de IGF-I después de 3 meses de ejercicio para verificar si hay diferencias que estén relacionados con los efectos beneficiosos del ejercicio, no observamos cambios significativos en los niveles de IGF-I en la corteza de los ratones APP/PS1, lo que puede deberse a que el tratamiento no fue lo suficientemente prolongado.

En resumen, los datos obtenidos confirman que el ejercicio físico modula varios componentes del estado de ánimo tales como la resistencia al estrés, el estado de atención y la ansiedad. Lo novedoso es que lo hace a través de mecanismos distintos dependientes del sexo. En el presente trabajo se aporta evidencia de la importancia de la relación del eje IGF-I y estradiol en el estado de ánimo en ratones hembra jóvenes, que no aparece en hembras de mediana edad ni en hembras APP/PS1, modelo de la enfermedad de Alzheimer. Tal vez una desregulación de la interacción de estas hormonas contribuya de forma significativa a las alteraciones en el control del estado de ánimo asociadas al envejecimiento y que están aún más acusadas en la enfermedad de Alzheimer.

La mayoría de las observaciones que se encuentran en la literatura provienen de estudios hechos en animales, por lo cual la extrapolación a humanos permanece pendiente. Además, las vías moleculares implicadas en los procesos de ansiedad y resistencia al estrés en animales jóvenes y como se deterioran con el envejecimiento permanecen sin elucidar. En este trabajo se ha empezado a determinar uno de los mecanismos por los que el ejercicio físico regula el estado de ánimo de forma diferencial en hembras jóvenes, apuntando a futuros estudios a lo largo de la edad.

Conclusiones

1. El ejercicio físico produce un efecto dependiente del género en el comportamiento antidepresivo y ansiolítico en ratones normales.
2. El IGF-I y el estradiol participan en la modulación del estado de ánimo a través del ejercicio físico
3. Los ratones hembra muestran incremento de los niveles de IGF-I en hipocampo después del ejercicio crónico en una forma dependiente de hormonas ováricas.
4. Las hormonas ováricas regulan la captura de IGF-I circulante en el cerebro mediante el receptor de estrógenos en las células endoteliales
5. El ejercicio físico incrementa la resistencia al estrés y el estado de alerta solo en hembras a través de estradiol e IGF-I, específicamente por el receptor de estrógenos alfa.
6. La desregulación fisiológica de las hormonas ováricas en hembras de mediana edad altera los niveles de IGF-I en respuesta a ejercicio físico, lo que se traduce en ausencia de un incremento en la resistencia al estrés tras ejercicio.

Bibliografía

Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. (2000) **Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor**. Cell Mol Life Sci. 57(7):1050-93.

Adhikari A. (2014) **Distributed circuits underlying anxiety**. Front Behav Neurosci. Apr 1;8:112.

Alzheimer's Association, 2014• Alzheimer's Association• 2014 Alzheimer's disease facts and figures• Alzheimers Dement., 10 pp. e47–e92

Ala T (2016); **Donepezil May Reduce Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) Levels in Alzheimer's disease**. CNS Neurol Disord Drug Targets. 15(1):108-12.

Allen PJ, D'Anci KE, Kanarek RB, Renshaw PF (2012) **Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats**. Pharmacol Biochem Behav; 101:588–601.

Andrus BM, Blizinsky K, Vedell PT, Dennis K, Shukla PK, Schaffer DJ, Radulovic J, Churchill GA, Redei EE. (2012) **Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models**. Mol Psychiatry. Jan; 17(1):49-61.

Anunziata M, Granata R, Ghigo (2011) **The IGF system**. Acta Diabetol. 48(1):1-9.

Arató M, Frecska E, Tekes K, MacCrimmon DJ. (1991) **Serotonergic interhemispheric asymmetry: gender difference in the orbital cortex**. Acta Psychiatr Scand. 84(1):110-1.

Archer J. (1975) **Rodent sex differences in emotional and related behavior**. Behav Biol. Aug; 14(4):451-79.

Archer T, Josefsson T, Lindwall M. (2014) **Effects of physical exercise on depressive symptoms and biomarkers in depression**. CNS Neurol Disord Drug Targets.; 13(10):1640-53.

Auer, M, Sievers C., Schneider H.J and Stalla G.K. (2003) **The GH/IGF-1-Axis in Psychopathological Functions** The Open Endocrinology Journal 6, 62-67.

Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. (1999) **Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling**. J Neurosci Res Dec 15; 58(6):815-22.

Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D (1991) **Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain**. Brain Res Mol Brain Res. 10(1):43-8.

Bach LA (2015) **Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins-an Update.** *Pediatr Endocrinol Rev.* Dec;13(2):521-30.

Bach LA. (2015) **Endothelial cells and the IGF system.** *J Mol Endocrinol.* 54(1):R1-13.

Baker LD, Frank LL, Foster-Schubert K, Green PS, Wilkinson CW, McTiernan A, Plymate SR, Fishel MA, Watson GS, Cholerton BA, Duncan GE, Mehta PD, Craft S. (2010) **Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial.** *Arch Neurol.* Jan;67(1):71-9.

Bailey KR, Crawley JN. (2009) **Anxiety-Related Behaviors in Mice.** In: **Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.** 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 5.

Banks WA, Kastin AJ. (1985) **Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration.** *Psychoneuroendocrinology.* 10(4):385-99.

Bansal P, Chaudhary A, Soni RK, Sharma S, Gupta VK, Kaushal P. (2015) **Depression and anxiety among middle-aged women: A community-based study.** *J Family Med Prim Care.* Oct-Dec;4(4):576-81.

Barnard RJ. (2007) **Prostate cancer prevention by nutritional means to alleviate metabolic syndrome.** *Am J Clin Nutr.* Sep;86(3):s889-93.

Baxter RC, Martin JL (1989) **Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function.** *Prog Growth Factor Res.*;1(1):49-68.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. (2009) **Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease.** *Endocr Rev.* 30(6):586-623.

Bellantoni MF, Vittone J, Campfield AT, Bass KM, Harman SM, Blackman MR. (1996) **Effects of oral versus transdermal estrogen on the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in younger and older postmenopausal women: a clinical research center study.** *J Clin Endocrinol Metab.* Aug;81(8):2848-53.

Benarroch EE (2012) **Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications.** *Neurology.* 79(21):2148-53.

Berchtold N.C. , Chinn G. , Chou M. , Kesslak J.P. , Cotman C.W. (2005) **Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus.** *Neuroscience.* 133(3):853-61.

Beyer C, Pawlak J, Karolczak M (2003) **Membrane receptors for oestrogen in the brain.** *J Neurochem* 87: 545–550.

Bickler PE, Fahlman CS (2004). **Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons.** *Neuroscience* 127: 673–683.

Bohacek J, Daniel JM (2009) **The ability of oestradiol administration to regulate protein levels of oestrogen receptor alpha in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats is altered following long-term ovarian hormone deprivation.** *J Neuroendocrinol.*21(7):640-7.

Bolós M, Fernandez S, Torres-Aleman I.(2010) **Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels.** *J Biol Chem.* Jun 4;285(23):17693-700.

Bondy CA, Lee WH. (1993) **Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications.** *Ann N Y Acad Sci.* Aug 27;692:33-43.

Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. (2002) **Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats.***Neuroscience.*;113(2):401-10.

Brisson BK, Barton ER.(2013).**New Modulators for IGF-I Activity within IGF-I Processing Products.** *Front Endocrinol (Lausanne).* 27;4:42.

Brocardo,P.S.,Boehme,F.,Patten,A.,Cox,A.,Gil,Mohapel,J.andChristie,B.R(2012).**Anxiety-anddepression-like behaviors are accompanied by an increasein oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise.** *Neuropharmacology* 62, 1607–1618.

Brundin,L.,Bjorkqvist,M.,Petersen,A.,andTraskman-Bendz,L.(2007). **Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder.** *Eur.Neuropsychopharmacol.* 17, 573–579.

Brundin,L.,Bjorkqvist,M.,Traskman-Bendz,L.,andPetersen,A.(2009).**Increased orexin levels in the cerebrospinal fluid the first year after a suicide attempt.** *J. Affect.Disord.* 113, 179–182.

de Bruijn RF, Janssen JA, Brugts MP, van Duijn CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Ikram MA. (2014) **Insulin-like growth factor-I receptor stimulating activity is associated with dementia.** *J Alzheimers Dis.*;42(1):137-42.

Busiguina S, Fernandez AM, Barrios V, Clark R, Tolbert DL, Berciano J, Torres-Aleman I.(2000) **Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors.**Neurobiol;7(6 Pt B):657-65.

Cameron OG, Hudson CJ. (1986) **Influence of exercise on anxiety level in patients with anxiety disorders.***Psychosomatics*; 27: 720-723.

Campos C, Rocha NB, Lattari E, Paes F, Nardi AE, Machado S.(2016) **Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors.** Expert Rev Neurother.16(6):723-34.

Cassilhas RC, Antunes HK, Tufik S, de Mello MT. (2010) **Mood, anxiety, and serum IGF-1 in elderly men given 24 weeks of high resistance exercise.** Percept Mot Skills. Feb;110(1):265-76.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. (2001) **Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection.** Brain Res Brain Res Rev. 37(1-3):320-34.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM.(2002) **Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications.** J Steroid Biochem Mol Biol. 83(1-5):211-7.

Carek PJ, Laibstain SE, Carek SM (2011) **Exercise for the treatment of depression and anxiety.** nt J Psychiatry Med.41(1):15-28.

Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. (2000) **Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain.** J Neurosci.20(8):2926-33.

Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I.(2001) **Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy.**J Neurosci.;21(15):5678-84.

Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I.(2002) **Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels.** Nat Med.8(12):1390-7.

Carro E, Torres-Aleman I (2004) **The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease.**Eur J Pharmacol.490(1-3):127-33.

Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I.(2005) **Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I.** J Neurosci.;25(47):10884-93.

Celec P., Ostatníková D., and Hodosy J. (2015) **On the effects of testosterone on brain behavioral functions** Front Neurosci.9:12.

Consoli D, Fedotova J, Micale V, Sapronov NS, Drago F. (2005) **Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test).** Eur J Pharmacol.520(1-3):100-7.

Cordoba-Chacón J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, de Lecea L, Castaño JP, Luque RM. **Cortistatin Is a (2016) Key Factor Regulating the Sex-Dependent Response of the GH and Stress Axes to Fasting in Mice.** Endocrinology.157(7):2810-23.

Chen WF, Zhou LP, Chen L, Wu L, Gao QG, Wong MS. (2013) **Involvement of IGF-I receptor and estrogen receptor pathways in the protective effects of ginsenoside Rg1 against A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity in PC12 cells.** Neurochem Int.62(8):1065-71.

Cheng J, Wang L, Xu L, Wang, H Liu P., Bu S, Ye M Zhang L, Wang Q, and Duan S (2013) **Gender-dependent miR-375 promoter methylation and the risk of type 2 diabetes** Exp Ther Med. Jun; 5(6): 1687–1692.

Chin YP, Keni J, Wan J, Mehta H, Anene F, Jia Y, Lue YH, Swerdloff R, Cobb LJ, Wang C, Cohen P (2013) **Pharmacokinetics and tissue distribution of humanin and its analogues in male rodents.** Endocrinology.154(10):3739-44.

Chisalita SI, Arnqvist HJ. (2004) **Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 286(6):E896-901.

Chowen JA, García-Segura LM, González-Parra S, Argente J. (1996) **Sex steroid effects on the development and functioning of the growth hormone axis.** Cell Mol Neurobiol;16(3):297-310.

Cicognani A, Cacciari E, Tacconi M, Pascucci MG, Tonioli S, Pirazzoli P, Balsamo A. (1989) **Effect of gonadectomy on growth hormone, IGF-I and sex steroids in children with complete and incomplete androgen insensitivity.** Acta Endocrinol;121(6):777-83.

Cocchi D, De Gennaro Colonna V, Bagnasco M, Bonacci D, Müller EE (1999). **Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions.** J Endocrinol. Jul; 162 (1):95-9.

Consoli D, Fedotova J, Micale V, Sapronov NS, Drago F. **Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test).** Eur J Pharmacol 2005;520:100–7.

Contreras CM, Martinez-Mota L, Saavedra M. (1998) **Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry; 22:1121–8.

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. (2007) **Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation.** Trends Neurosci. Sep;30(9):464–72.

D'Ercole AJ, Willson DF, Underwood LE. (1980) **Changes in the circulating form of serum somatomedin-C during fetal life.** J Clin Endocrinol Metab.51(3):674–6.

Dean, SL Wright, CL Hoffman JF, Wang M, Alger, BE McCarthy MM (2012) **Prostaglandin E2 stimulates estradiol synthesis in the cerebellum postnatally with associated effects on Purkinje neuron dendritic arbor and electrophysiological properties** Endocrinology, 153, 5415–5427,

Delafontaine P, Song YH, Li Y. (2004) **Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels.**Arterioscler Thromb Vasc Biol.24(3):435–44.

Deyev, I. E., Popova, N. V., & Petrenko, A. G. (2015). **Determination of Alkali-Sensing Parts of the Insulin Receptor-Related Receptor Using the Bioinformatic Approach.** *Acta Naturae*, 7(2), 80–86.

Doulazmi M, Frédéric F, Lemaigre-Dubreuil Y, Hadj-Sahraoui N, Delhay-Bouchaud N, Mariani J (1999) **Cerebellar Purkinje cell loss during life span of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+)/Rora(sg)) is gender-related** The Journal of Comparative Neurology, 411, 267–273.

Duman RS. (2005) **Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism.** Neurobiol Aging. 1:88–93

Duman CH, Schlesinger L, Russell DS, (2008) **Duman RS Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice.** Brain Res. Mar 14;1199:148–58.

Duman CH, Schlesinger L, Terwilliger R, Russell DS, Newton SS, Duman RS. (2009) **Peripheral insulin-like growth factor-I produces antidepressant-like behavior and contributes to the effect of exercise.** Behav Brain Res. 198(2):366–71.

Easton A, Norton J, Goodwillie A, Pfaff DW. (2004) **Sex differences in mouse behavior following pyrilamine treatment: role of histamine 1 receptors in arousal.** Pharmacol Biochem Behav.79(3):563–72.

Emeny RT, Bidlingmaier M, Lacruz ME, Linkohr B, Peters A, Reincke M, Ladwig KH (2014) **Mind over hormones: sex differences in associations of well-being with IGF-I, IGFBP-3 and physical activity in the KORA-Age study.** Exp Gerontol.;59:58-64.

Farabollini, F.; File, S. E.; Johnston, A. L.; Wilson, C. A. (1987) **An analysis of sex differences in the open field and tests of exploration and anxiety.** Br. J. Pharmacol. 90:265.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. (2012) **The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain.** Nat Rev Neurosci. 20;13(4):225-39.

Filon JR, Intorcchia AJ, Sue LI, Vazquez Arreola E, Wilson J, Davis KJ, Sabbagh MN, Belden CM, Caselli RJ, Adler CH, Woodruff BK, Rapsack SZ, Ahern GL, Burke AD, Jacobson S, Shill HA, Driver-Dunckley E, Chen K, Reiman EM, Beach TG, Serrano GE.(2016) **Gender Differences in Alzheimer Disease: Brain Atrophy, Histopathology Burden, and Cognition.** J Neuropathol Exp Neurol. 12. pii: nlw047.

Fontana L, Klein S, Holloszy JO. (2010) **Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production.** Age (Dordr).32(1):97-108.

Friedlander AL, Butterfield GE, Moynihan S, Grillo J, Pollack M, Holloway L, Friedman L, Yesavage J, Matthias D, Lee S, Marcus R, Hoffman AR (2001) **One year of insulin-like growth factor I treatment does not affect bone density, body composition, or psychological measures in postmenopausal women.** J Clin Endocrinol Metab.;86(4):1496-503.

Frystyk J (2004) **Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis.** Growth Horm IGF Res.;14(5):337-75.

Gambera A, Scagliola P, Falsetti L, Sartori E, Bianchi U. (2004) **Androgens, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and carrier proteins (SHBG, IGFBP-3) in postmenopause.** Menopause;11(2):159-66.

Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM (2014) **Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice.** Nat Neurosci.17(5):667-9.

Garey J, Goodwillie A, Frohlich J, Morgan M, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS, Ogawa S, Pfaff DW. (2003) **Genetic contributions to generalized arousal of brain and behavior.** Proc Natl Acad Sci U S A. 100(19):11019-22

Gatenby VK, Imrie H, Kearney M (2013)**The IGF-1 receptor and regulation of nitric oxide bioavailability and insulin signalling in the endothelium.** Pflugers Arch. 465(8):1065-74.

Geary MP, Pringle PJ, Rodeck CH, Kingdom JC, Hindmarsh PC (2003) **Sexual dimorphism in the growth hormone and insulin-like growth factor axis at birth.** J Clin Endocrinol Metab;88(8):3708-14.

Giacobini MM, Olson L, Hoffer BJ, Sara VR(1990) **Truncated IGF-1 exerts trophic effects on fetal brain tissue grafts.** Exp Neurol. 108(1):33-7.

Greenwood BN, Spence KG, Crevling DM, Clark PJ, Craig WC, Fleshner M. (2013) **Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex.** Eur J Neurosci.;37(3):469-78.

Gray JA, Lalljee B (1974) **Sex differences in emotional behaviour in the rat: correlation between open-field defecation and active avoidance.** Anim Behav. Nov;22(4):856-61.

Grønborg M, Wulff BS, Rasmussen JS, Kjeldsen T, Gammeltoft S (1993)**Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase.** J Biol Chem. 268(31):23435-40.

Goel N, Workman JL, Lee TT, Innala L, Viau V. (2014) **Sex differences in the HPA axis.** Compr Physiol.4(3):1121-55.

Grissom EM, Hawley WR, Bromley-Dulfano SS, Marino SE, Stathopoulos NG, Dohanich GP (2012) **Learning strategy is influenced by trait anxiety and early rearing conditions in prepubertal male, but not prepubertal female rats.** *Neurobiol Learn Mem.*98(2):174-81.

Grissom EM, Daniel JM (2016).**Evidence for ligand-independent activation of hippocampal estrogen receptor alpha by insulin-like growth factor-1 in hippocampus of ovariectomized rats.** *Endocrinology.*157(8):3149-56.

Hambrecht R, Schulze PC, Gielen S, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S, Kratzsch J, Schubert A, Adams V, Schuler G. (2005) **Effects of exercise training on insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of non-cachectic patients with chronic heart failure.** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.12(4):401-6.

Hamilton J (2015) **Women's Brains Appear More Vulnerable To Alzheimer's Than Men** www.npr.org.

Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA(1994) **Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.** Horm Behav. 28(4):464-76.

Hawkins BT, Davis TP. (2005) **The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease.** Pharmacol Rev. 57(2):173-85.

Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA. **Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men?** Am J Epidemiol. 2001;153:132–136. doi: 10.1093/aje/153.2.132.

Hede MS, Salimova E, Piszczek A, Perlas E, Winn N, Nastasi T, Rosenthal N. (2012) **E-peptides control bioavailability of IGF-1.** PLoS One.;7(12):e51152.

Henderson VW, St John JA, Hodis HN, McCleary CA, Stanczyk FZ, Shoupe D, Kono N, Dustin L, Allayee H, Mack WJ. (2016) **Cognitive effects of estradiol after menopause: A randomized trial of the timing hypothesis.** Neurology. Aug 16;87(7):699-708.

Herring MP, O'Connor PJ, Dishman RK. (2010). **The effect of exercise training on anxiety symptoms among patients: a systematic review.** Arch Intern Med. Feb 22;170(4):321-31.

Hoffmann K, Sobol NA, Frederiksen KS, Beyer N, Vogel A, Vestergaard K, Brændgaard H, Gottrup H, Lolk A, Wermuth L, Jacobsen S, Laugesen LP, Gergelyffy RG, Høgh P, Bjerregaard E, Andersen BB, Siersma V, Johannsen P, Cotman CW, Waldemar G, Hasselbalch SG.(2016) **Moderate-to-High Intensity Physical Exercise in Patients with Alzheimer's Disease: A Randomized Controlled Trial.** J Alzheimers Dis.50(2):443-53.

Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S. (2009) **Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus.**Endocrinology. Nov;150(11):5106-12.

ter Horst JP, de Kloet ER, Schächinger H, Oitzl MS (2012). **Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition.** Cell Mol Neurobiol. 32(5):725-35.

Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I (2005) **Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects.** Brain Res.;1037(1-2):204-8.

Hua X, Hibar DP, Lee S, Toga AW, Jack CR Jr, Weiner MW, Thompson PM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.(2010) **Sex and age differences in atrophic rates: an ADNI study with n=1368 MRI scans.** Neurobiol Aging. 31(8):1463-80,

Huang, J., Li, X., Qiao, T., Bambara, R. A., Hilf, R., & Muyan, M. (2006). **A tale of two estrogen receptors (ERs): how differential ER-estrogen responsive element interactions contribute to subtype-specific transcriptional responses.** Nuclear Receptor Signaling, 4, e015.

Hsu DT, Price JL (2009). **Paraventricular thalamic nucleus: subcortical connections and innervation by serotonin, orexin, and corticotropin-releasing hormone in macaque monkeys.** J Comp Neurol 512: 825–848.

Hyde JS, Mezulis AH, Abramson LY.(2008) **The ABCs of depression: integrating affective, biological, and cognitive models to explain the emergence of the gender difference in depression.**Psychol Rev.;115(2):291-313.

Inoue Koshiro, Masahiro Okamoto, Junko Shibato, Min Chul Lee, Takashi Matsui, Randeep Rakwal, Hideaki Soya (2015) **Long-Term Mild, rather than Intense, Exercise Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis and Greatly Changes the Transcriptomic Profile of the Hippocampus** PLoS One.; 10(6): e0128720

Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. (1987) **Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth.** Endocr Rev.8(4):426-38.

Jacobson L, Sapolsky R (1991) **The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.** Endocr Rev.;12(2):118-34.

Jansson JO, Edén S, Isaksson O.(1985) **Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion.** Endocr Rev.;6(2):128-50.

Johnston AL, File SE (1991) **Sex differences in animal tests of anxiety.** Physiol Behav. Feb;49(2):245-50.

Jost A. (1970) **Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 259 (828). 119–130

Judd H.L., Fournet N. (1994), **Changes of ovarian hormonal function with aging** *Experimental Gerontology*, 29. 285–298.

Jun-Li Liu, Shoshana Yakar, and Derek LeRoith (2000) **Mice Deficient in Liver Production of Insulin-Like Growth Factor I Display Sexual Dimorphism in Growth Hormone-Stimulated Postnatal Growth** *Endocrinology* 114:12, 4436-4441.

Junnala RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. (2013)**The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity.** Nat Rev Endocrinol.;9(6):366-76.

Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. (2010) **Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition.** Neurosci Biobehav Rev.35(1):2-16.

Kajantie E, Phillips DI.(2006) **The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress.** Psychoneuroendocrinology. 2006;31:151–78.

Kim TW, Lim BV, Kim K, Seo JH, Kim CJ. (2015) **Treadmill exercise alleviates stress-induced impairment of social interaction through 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation in rats.** *J Exerc Rehabil.* 30;11(4):192-7.

Kokras N, Dalla C, Sideris AC, Dendi A, Mikail HG, Antoniou K, et. al.. **Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity.** *Neuropharmacology* 2012;62:436–45.

Krattenmacher R, Knauthe R, Parczyk K, Walker A, Hilgenfeldt U, Fritzemeier KH. (1994) **Estrogen action on hepatic synthesis of angiotensinogen and IGF-I: direct and indirect estrogen effects.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 48(2-3):207-14

Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ (2007) **Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner.** *Brain Res.* 1154:144-53.

Kudielka BM, Kirschbaum C.(2005) **Sex differences in HPA axis responses to stress: a review.** *Biol Psychol*;69(1):113-32.

Kudwa AE, McGivern RF, Handa RJ (2014) **Estrogen receptor β and oxytocin interact to modulate anxiety-like behavior and neuroendocrine stress reactivity in adult male and female rats.** *Physiol Behav*;129:287-96

Lambourne K, Tomporowski P.(2010) **The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: a meta-regression analysis.** *Brain Res.*; 1341:12-24.

Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, Giorgino F.(2008) **Abnormalities of IGF-I signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain, and fetoplacental unit in humans.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.*295(5):E991-9.

Lehmann M, André F, Bellan C, Remacle-Bonnet M, Garrouste F, Parat F, Lissitsky JC, Marvaldi J, Pommier G. (1998) **Deficient processing and activity of type I insulin-like growth factor receptor in the furin-deficient LoVo-C5 cells.** *Endocrinology.*139 (9):3763-71.

Liu JL, Grinberg A, Westphal H, Sauer B, Accili D, Karas M, LeRoith D.(1998)**Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice.** *Mol Endocrinol.* 12:9,1452-1462.

Loucks AB (2003) **Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women.** *Exerc Sport Sci Rev.* 31(3):144-8

Lund T.D., Rovis T., Chung W.C. & Handa R.J. (2005) Novel actions of estrogen receptor- β on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146:797-807.

Ma ZQ, Santagati S, Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Maggi A (1994) **Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3.** *Mol Endocrinol.* 8(7):910-8.

Masahiro Okamoto, Yasushi Hojo, Koshiro Inoue, Takashi Matsui, Suguru Kawato, Bruce S. McEwen, and Hideaki Soya (2012) **Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis.** *PNAS* 109 (32) 13100-13105

Malberg J.E, Platt B, Sukoff Rizzo S.J, Ring R.H Lucki I, Schechter L.E and Rosenzweig-Lipson S. (2007) **Increasing the Levels of Insulin-Like Growth Factor-I by an IGF Binding Protein Inhibitor Produces Anxiolytic and Antidepressant-Like Effects** *Neuropsychopharmacology* 32, 2360–2368.

Majorczyk M, Smolağ D.(2016) **Effect of physical activity on IGF-1 and IGFBP levels in the context of civilization diseases prevention.** *Rocz Panstw Zakl Hig.* 67(2):105-11.

Mahmoud R, Wainwright SR, Chaiton JA, Liebllich SE, Galea LA.(2016) **Ovarian hormones, but not fluoxetine, impart resilience within a chronic unpredictable stress model in middle-aged female rats.** *Neuropharmacology.* Aug;107:278-93.

Mardinly AR, Spiegel I, Patrizi A, Centofante E, Bazinet JE, Tzeng CP, Mandel-Brehm C, Harmin DA, Adesnik H, Fagiolini M, Greenberg ME. (2016) **Sensory experience regulates cortical inhibition by inducing IGF1 in VIP neurons.** *Nature*;531(7594):371-5.

Masters MC, Morris JC, Roe CM. "Noncognitive" symptoms of early Alzheimer disease: a longitudinal analysis. *Neurology.* 10;84(6):617-22.

McDonnell MN, Smith AE, Mackintosh SF. (2011) **Aerobic exercise to improve cognitive function in adults with neurological disorders: a systematic review.** *Arch Phys Med Rehabil.* 92(7):1044-52.

McTiernan A, Tworoger S, Ulrich C, Yasui Y, Irwin M, Kumar B. Rajan, Bess Sorensen, Rebecca E. Rudolph, Deborah Bowen, Frank Z. Stanczyk, Potter JD, and Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM.(2003) **Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain.** *Brain Res Mol Brain Res*;112(1-2):170-6.

McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, Yasui Y, Irwin ML, Rajan KB, Sorensen B, Rudolph RE, Bowen D, Stanczyk FZ, Potter JD, Schwartz RS (2004) **Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women: a 12-month randomized clinical trial.** *Cancer Res.* 64(8):2923-8.

Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM.(2003) **Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain.** Brain Res Mol Brain Res.112(1-2):170-6.

Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura LM.(2006) **Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms.** Front Neuroendocrinol. 2006 Dec;27(4):391-403.

Mong JA, Devidze N, Frail DE, O'Connor LT, Samuel M, Choleris E, Ogawa S, Pfaff DW. (2003) **Estradiol differentially regulates lipocalin-type prostaglandin D synthase transcript levels in the rodent brain: Evidence from high-density oligonucleotide arrays and in situ hybridization.** Proc Natl Acad Sci U S A.100(1):318-23.

Monninkhof EM, Velthuis MJ, Peeters PH, Twisk JW, Schuit AJ. (2009) **Effect of exercise on postmenopausal sex hormone levels and role of body fat: a randomized controlled trial.** J Clin Oncol. 2009 Sep 20; 27(27):4492-9.

Motaghinejad M, Motevalian M, Larijani SF, Khajehamedi Z (2015) **Protective effects of forced exercise against methylphenidate-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat.** Adv Biomed Res. 27;4:134.

Moodley K.K. and Chan D. (2014).**The Hippocampus in Neurodegenerative Disease** Front Neurol Neurosci. 34, 95-108.

Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, Gore AC.(2006) Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women.J Neurosci. ;26(41):10332-48.

Moser DR, Lowe WL Jr, Dake BL, Booth BA, Boes M, Clemmons DR, Bar RS (1992) **Endothelial cells express insulin-like growth factor-binding proteins 2 to 6.** Mol Endocrinol.6(11):1805-14.

Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) **Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons.** J Neurochem.100(4):950-67.

Murphy LJ, Friessen HG.(1988) **Differential effects of estrogen and GH on uterine and hepatic insulin-like growth factor-I gene expression in ovariectomized hypophysectomized rats.** Endocrinology. 122:325–332.

Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR (2011) **Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology.** *Nat Rev Neurosci.*12(3):169-82.

Nolen-Hoeksema S.(2012) **Emotion regulation and psychopathology: the role of gender.** *Annu Rev Clin Psychol*;8:161-87.

Nolen-Hoeksema S (2012) **Emotion regulation and psychopathology: the role of gender.** *Annu Rev Clin Psychol.* 8:161-87.

Nolen-Hoeksema S. (1991) **Responses to depression and their effects on the duration of depressive episodes.** *J Abnorm Psychol.*100(4):569-82.

Norton S, Matthews FE,Barnes DE,Yaffe K, Brayne C (2014) **Potencial for primary prevention of Alzheimers disease: an analysis of population based data.** *Lancet Neurol*; 13: 788-794.

Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nuñez A, Torres-Aleman I. (2010) **Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS.** *Neuron.* 9;67(5):834-46.

Nguyen UN, Mougin F, Simon-Rigaud ML, Rouillon JD, Marguet P, Regnard J.(1998) **Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes.***Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*78(6):533-7.

Ocrant I, Fay CT, Parmelee JT. (1990) **Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system.***Endocrinology.*127(3):1260-7.

Oyola MG, Portillo W, Reyna A, Foradori CD, Kudwa A, Hinds L, Handa RJ, Mani SK. (2012) **Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor- β (ER β) activation by a selective ER β agonist in female mice.***Endocrinology.* 153(2):837-46.

Pimenta F, Maroco J, Leitão M, Leal I. (2016) **Predictors of stress and depressive mood in Portuguese middle-aged women.** *J Women Aging.*;28(5):444-53.

Pines A (2016) **Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment.** *Climacteric.* 21:1-3.

Phoenix CH,Goy RW, Gerall AA,Young WC. (1959) **Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig.** *Endocrinology,*65:369-82.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. (1977) **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** *Nature*.266(5604):730-2.

Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. (2009) **miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass.** *Proc Natl Acad Sci U S A*.106(14):5813-8. .

Pritzlaff-Roy CJ, Widemen L, Weltman JY, Abbott R, Gutgesell M, Hartman ML, Veldhuis JD, Weltman A (2002) **Gender governs the relationship between exercise intensity and growth hormone release in young adults.** *J Appl Physiol*.;92(5):2053-60.

Prossnitz E.R., Maggiolini M (2009),**Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308. 32–38

Raz L., Khan M.M., Mahesh V.B., Vadlamudi R.K., Brann D.W. (2008), **Rapid estrogen signaling in the brain** *Neuro-Signals*, 16. 140–153.

Rettoberg JR, Dang H, Hodis HN, Henderson VW, St John JA, Mack WJ, Brinton RD.(2016) **Identifying postmenopausal women at risk for cognitive decline within a healthy cohort using a panel of clinical metabolic indicators: potential for detecting an at-Alzheimer's risk metabolic phenotype.** *Neurobiol Aging*. Apr;40:155-63.

Rethorst CD, Trivedi MH. (2013) **Evidence-based recommendations for the prescription of exercise for major depressive disorder.** *J Psychiatr Pract*. May;19(3):204-12.

Reitz C, Tang MX, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA.(2010)**A summary risk score for the prediction of Alzheimer disease in elderly persons.** *Arch Neurol*. 67(7):835-41.

Rhodes ME, Rubin RT. (1999) **Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review.** *Brain Res Brain Res Rev*.;30(2):135-52.

Rinderknecht E, Humbel RE. (1978) **The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin.***J Biol Chem*. Apr 25;253(8):2769-76.

Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, Ahlskog JE, Grossardt BR, de Andrade M, Melton LJ 3rd.(2007)**Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause.** *Neurology*.69(11):1074-83.

Rodríguez SS, Schwerdt JI, Barbeito CG, Flamini MA, Han Y, Bohn MC, Goya RG (2013) **Hypothalamic IGF-I gene therapy prolongs estrous cyclicity and protects ovarian structure in middle-aged female rats.** *Endocrinology*. 154(6):2166-73.

Roig M, Nordbrandt S, Geertsens SS, Nielsen JB. (2013) **The effects of cardiovascular exercise on human memory: a review with meta-analysis.** *Neurosci Biobehav Rev*. Sep;37(8):1645-66.

Rojas Vega S, Knicker A, Hollmann W, Bloch W, Strüder HK. 2010 **Effect of resistance exercise on serum levels of growth factors in humans.** *Horm Metab Res*. Dec;42(13):982-6.

Ronnekleiv OK, Malyala A, Kelly MJ (2007). **Membrane initiated signaling of estrogen in the brain.** *Semin Reprod Med* 25: 165–177.

Rusch HL, Guardado P, Baxter T, Mysliwiec V, Gill JM. (2015) **Improved Sleep Quality is Associated with Reductions in Depression and PTSD Arousal Symptoms and Increases in IGF-1 Concentrations.** *J Clin Sleep Med*. 11(6):615-23.

Russell-Aulet M, Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, Barkan AL.(2001) **Aging-related growth hormone (GH) decrease is a selective hypothalamic GH-releasing hormone pulse amplitude mediated phenomenon.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.56(2):M124-9.

Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA (2005) **The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain.** *Endocr Rev*. Dec;26(7):916-43.

Sandoval KE, Witt KA. (2011) **Age and 17 β -estradiol effects on blood-brain barrier tight junction and estrogen receptor proteins in ovariectomized rats.** *Microvasc Res*. Mar;81(2):198-205.

Salmon WD JR, Daughaday WH. (1957) **A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro.** *J Lab Clin Med*. 49(6):825-36.

Salmon P. **Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory.** *Clin Psychol Rev*. 2001 Feb;21(1):33-61.

Saltiel AR, Kahn CR.(2001) **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** *Nature*.414(6865):799-806.

Sánchez JC, López-Zapata DF, Pinzón OA (2014) **Effects of 17 β -estradiol and IGF-1 on L-type voltage-activated and stretch-activated calcium currents in cultured rat cortical neurons.** *Neuro Endocrinol Lett*.;35(8):724-32.

Santollo J, Eckel LA.(2009) **Effect of a putative ERalpha antagonist, MPP, on food intake in cycling and ovariectomized rats.** *Physiol Behav.* 97(2):193-8.

Schlechter NL Russell SM, Spencer EM, Nicoll CS (1986) **Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;83(20):7932-4.

Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. (1983) **Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status.** *Endocrinology.* Jul;113 (1):297-305.

Schwartz RS.(2004) **Effect of Exercise on Serum Estrogens in Postmenopausal Women: A 12-Month Randomized Clinical Trial** *Cancer Research* 64, 2923–2928.

Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Törnell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C. (1999) **Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*96(12):7088-92.

Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. (2016) **Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age.** *Mol Brain.* Jan 28;9:11.

Smith AJ, Phipps WR, Thomas W, Schmitz KH, Kurzer MS (2013)**The effects of aerobic exercise on estrogen metabolism in healthy premenopausal women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*22(5):756-64.

Soma K. K. (2006) **Testosterone and Aggression: Berthold, Birds and Beyond.** *J Neuroendocrinol.*18(7): 543–551.

Sonntag WE, Lynch CD, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso-Bechtold JK.(1999) **Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats.** *Neuroscience.* 88(1):269-79.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. (1985) **The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.** *Psychopharmacology (Berl).*;85(3):367-70.

Stirone C, Duckles SP, Krause DN (2003) **Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.*;284(1).

Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Joyner M, Martin MB. (2000) **Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor-alpha gene expression.** *J Cell Biochem.*76(4):605-14.

Stonerock GL, Hoffman BM, Smith PJ, Blumenthal JA. (2015) **Exercise as Treatment for Anxiety: Systematic Review and Analysis.** Ann Behav Med. Aug; 49(4):542-56.

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. (2002) **Cells in focus: endothelial cell.** Int J Biochem Cell Biol.34(12):1508-12.

Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. (2012) **Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline.**J Clin Invest.122(4):1316-38.

Torres-Aleman I (2010).**Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I.**Dev Neurobiol.70(5):384-96.

Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker SD, Poole-Wilson PA, Borlak J, Ertl G, Bauersachs J.(2007) **Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1.** Circ Res. 100(3):434-43.

Trejo J.L.', Llorens-Martín M.V., Torres-Alemán I. (2008) **The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis** *Mol Cell Neurosci* 37:2, , 402–411

Trueba-Saiz Á, Fernandez AM, Nishijima T, Mecha M, Santi A, Munive V, Torres-Alemán I. (2016) **Circulating Insulin-like Growth Factor I Regulates Its Receptor in the Brain of Male Mice.** Endocrinology. en20161468.

Tsai CL, Wang CH, Pan CY, Chen FC, Huang TH, Chou FY. (2014) **Executive function and endocrinological responses to acute resistance exercise.** Front Behav Neurosci.1;8:262.

Tsutsumi T, Don BM, Zaichkowsky LD, Takenaka K, Oka K, Ohno T.(1998) **Comparison of high and moderate intensity of strength training on mood and anxiety in older adults.** Percept Mot Skills.87(3 Pt 1):1003-11.

Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH,Chae KR (2008) **Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-Transgenic model.** *Int J Mol Med*; 22: 384-391.

van Varsseveld NC, Sohl E, Drent ML, Lips P (2015) **Gender-Specific Associations of Serum Insulin-Like Growth Factor-1 With Bone Health and Fractures in Older Persons.** J Clin Endocrinol Metab. 100(11):4272-81.

Vest RS, Pike CJ.(2013) **Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease.** Horm Behav. ;63(2):301-7.

Vega-Rivera NM, López-Rubalcava C, Estrada-Camarena E. (2013) **The antidepressant-like effect of ethynyl estradiol is mediated by both serotonergic and noradrenergic systems in the forced swimming test.** Neuroscience; 250:102-11.

Veldhuis JD, Erickson D, Yang R, Takahashi P, Bowers C.(2016) **Endogenous Estrogen Regulates Somatostatin-Induced Rebound GH Secretion in Postmenopausal Women.** J Clin Endocrinol Metab.101(11):4298-4304.

Viña J, Lloret A.(2010) **Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide.** J Alzheimers Dis;20 Suppl 2:S527-33.

de Vries G J. and Forger N. (2015) **Sex differences in the brain: a whole body perspective** Biol Sex Differ.; 6: 15.

Vijay R. Varma, Yi-fang Chuang, Gregory C. Harris, Erwin J. Tan, Michelle C. Carlson(2015) **Low-intensity daily walking activity is associated with hippocampal volume in older adults** Hippocampus.25(5): 605–615.

Vitale G, Brugts MP, Ogliari G, Castaldi D, Fatti LM, Varewijck AJ, Lamberts SW, Monti D, Bucci L, Cevenini E, Cavagnini F, Franceschi C, Hofland LJ, Mari D, Janssen J. (2012) **Low circulating IGF-I bioactivity is associated with human longevity: findings in centenarians' offspring.** Aging (Albany NY).;4(9):580-9.

Webster S, Bachstetter A and Van Eldik L (2013) **Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease.** Alzheimer's Research & Therapy, 5:28.

Wei J, Yuen EY, Liu W, Li X, Zhong P, Karatsoreos IN, McEwen BS, Yan Z(2014) **Estrogen protects against the detrimental effects of repeated stress on glutamatergic transmission and cognition.** Mol Psychiatry. May;19(5):588-98.

Westwood AJ, Beiser A, Decarli C, Harris TB, Chen TC, He XM, Roubenoff R, Pikula A, Au R, Braverman LE, Wolf PA, Vasan RS, Seshadri S.(2014).**Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy.** Neurology. 2014 May 6;82(18):1613-9.

Wideman L, Consitt L, Patrie J, Swearingin B, Bloomer R, Davis P, Weltman A.(2006) **The impact of sex and exercise duration on growth hormone secretion.** J Appl Physiol (1985).101(6):1641-7.

Wijayaratne AL, McDonnell DP (2001) **The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists,**

antagonists, and selective estrogen receptor modulators. J Biol Chem. Sep 21;276(38):35684-92.

Wiley AS, Lubree HG, Joshi SM, Bhat DS, Ramdas LV, Rao AS, Thuse NV, Deshpande VU, Yajnik CS. (2016) **Cord IGF-I concentrations in Indian newborns: associations with neonatal body composition and maternal determinants.** *Pediatr Obes.* 11(2):151-7.

Witty CF, Gardella LP, Perez MC, Daniel JM. (2013) **Short-term estradiol administration in aging ovariectomized rats provides lasting benefits for memory and the hippocampus: a role for insulin-like growth factor-I.** *Endocrinology.*;154:842–852.

Yakar S, Liu JL., Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. (1999) **Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*;96(13):7324-9.

Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S, Kita I (2007) **Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats.** *Life Sci* 80: 356–363.

Yau SY, Li A, Zhang ED, Christie BR, Xu A, Lee TM, So KF.(2014) **Sustained running in rats administered corticosterone prevents the development of depressive behaviors and enhances hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity without increasing neurotrophic factor levels.***Cell Transplant.*;23(4-5):481-92.

Yazdkhasti M, Simbar M, Abdi F. (2015) **Empowerment and coping strategies in menopause women: a review.** *Iran Red Crescent Med J.*17(3):e18944.

Yi P, Driscoll M D,Huang J,Bhagat S, Hilf R, Bambara RA, and Muyan M (2002)**The Effects of Estrogen-Responsive Element- and Ligand-Induced Structural Changes on the Recruitment of Cofactors and Transcriptional Responses by ER α and ER β** *Molecular Endocrinology* 16:4, 674-693

Yuede CM, Zimmerman SD,Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM(2009) **Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease,** *Neurobiol Dis* ;35: 426-432.

Yuen EY, Wei J, Yan Z. (2016) **Estrogen in prefrontal cortex blocks stress-induced cognitive impairments in female rats.** *J Steroid Biochem Mol Biol.*160:221-6.

Xiao J, Xu T, Li J, Lv D, Chen P, Zhou Q, Xu J (2014) **Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells.** *Int J Clin Exp Pathol.* 7(2):663-9.

Zajadacz B, Skarpańska-Stejnborn A, Brzenczek-Owczarzak W., Juskiewicz A., Naczki M., Adach Z (2009) **The influence of physical exercise on alterations in concentrations of neuropeptide y, leptin and other selected hormonal and metabolic parameters in sportspeople** Biology of Sport, 26, 4.

Zahn-Waxler C, Shirtcliff EA, Marceau K.(2008) **Disorders of childhood and adolescence: gender and psychopathology.** Annu Rev Clin Psychol.;4:275-303.

Zhao L, Mao Z, Woody SK, Brinton RD. (2016) **Sex differences in metabolic aging of the brain: insights into female susceptibility to Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging.42:69-79.

Ziv E, Hu D.(2011) **Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity.** Ageing Res Rev.10(2):201-4.

Zlokovic BV. (2008) **The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.**Neuron. 57(2):178-201.

Anexos